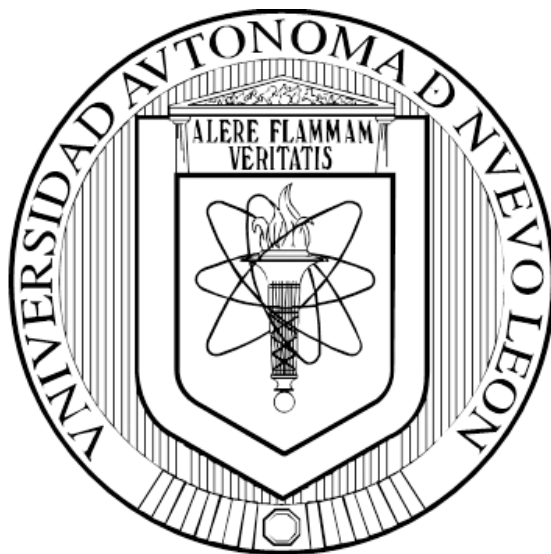


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS OBTENIDAS  
DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE MATERIA VEGETAL**

**POR**

**ÁNGEL JOSUÉ ARTEAGA GARCÉS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

**DICIEMBRE 2013**

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS OBTENIDAS A PARTIR DE  
MICROORGANISMOS AISLADOS DE MATERIA VEGETAL

Aprobación de la Tesis:

---

Dra. Ma. Elena Cantú Cárdenas

Director de Tesis

---

Dr. Sergio Salvador Fernández Delgadillo

Comité Tutorial

---

Dr. Alberto Gómez Treviño

Comité Tutorial

---

Dra. Yolanda Gracia Vásquez

Comité Tutorial

## RESUMEN

**Ángel Josué Arteaga Garcés**

**Fecha de Graduación: Enero, 2014**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Título de estudio:** Producción y caracterización de enzimas celulolíticas obtenidas a partir de microorganismos aislados de materia vegetal

**Número de Páginas: 78**

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada**

**Área de estudio: Microbiología Aplicada**

**Propósito y Método de estudio:** Existe una gran cantidad de microorganismos con capacidad para producir enzimas y degradar residuos lignocelulósicos para la obtención de azúcares que puedan fermentarse para producir biocombustibles, sin embargo; algunos de ellos las producen en muy baja cantidad o las condiciones de cultivo son costosas o difíciles de implementar. Se buscaron microorganismos con potencial para degradar eficientemente la biomasa vegetal, que no presenten altos costos ni requerimientos en el cultivo y se produjeran enzimas celulolíticas, las cuales fueron purificadas y caracterizadas.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se logró aislar e identificar un hongo filamentoso con capacidad de producir diversos tipos de enzimas celulolíticas, las cuales se caracterizaron y purificaron hasta los niveles requeridos para su análisis. La producción de las enzimas no generó elevados costos ni requerimientos nutricionales complejos, al tiempo que los productos residuales del proceso se pueden utilizar posteriormente para otros fines. Las enzimas producidas mostraron niveles de actividad comparables con las enzimas celulolíticas obtenidas a partir de otros procesos biotecnológicos y de los preparados comerciales.

**FIRMA DEL ASESOR:**

---

Dra.Ma. Elena Cantú Cárdenas

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Estructura y función de la celulosa .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Enzimas celulolíticas.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1 Microorganismos con capacidad de producir enzimas celulolíticas .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2 Mecanismo de acción de las celulasas .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Aplicaciones de las enzimas celulolíticas.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1 Industria textil .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2 Industria alimenticia .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3 Industria del papel.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.4 Biocombustibles .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Producción de enzimas celulolíticas.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.1 Fermentación en fase sólida .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4.2 Tipos de reactores para una fermentación en fase sólida .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Antecedentes.....</b>	<b>16</b>
<b>2. HIPÓTESIS, OBJETIVO Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Hipótesis.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Objetivos .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1Específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Justificación .....</b>	<b>22</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Materiales .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1 Obtención de la muestra de materia vegetal para el aislamiento de microorganismos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2 Residuos lignocelulósicos para la evaluación de la producción de enzimas celulolíticas.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Equipos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Métodos .....</b>	<b>25</b>

3.3.1 Aislamiento de hongos filamentosos a partir de materia vegetal en descomposición. ....	25
3.3.2 Prueba de la actividad celulolítica en placa .....	25
3.3.3 Caracterización del microorganismo seleccionado.....	27
3.3.3.2 Determinación de las características microscópicas .....	27
3.3.3.3 Caracterización molecular del microorganismo seleccionado.....	27
3.3.3.3.1 Extracción del DNA genómico del hongo filamentosos.....	28
3.3.3.3.2 Amplificación y secuenciación del ITS 5.8S RNA del microorganismo .....	29
3.3.4 Producción de enzimas celulolíticas .....	30
3.3.4.1 Estandarización de inóculos .....	30
3.3.4.2 Condiciones de la fermentación en sustrato sólido .....	31
3.3.4.3 Monitoreo de la producción de enzimas celulolíticas en función del crecimiento microbiano.....	32
3.3.5 Extracción y purificación del concentrado enzimático.....	33
3.3.6 Purificación de la fracción soluble (salting out).....	34
3.3.7 Cromatografía de permeación en gel .....	35
3.3.8 Separación electroforética de las muestras concentradas.....	36
3.3.9 Caracterización de las enzimas por peso molecular .....	37
3.3.9.1 Cálculo del peso molecular de las proteínas .....	38
3.3.9.2 Técnica del fraccionamiento de geles de poliacrilamida.....	39
3.3.10 Caracterización mediante la determinación de actividad enzimática ...	39
3.3.10.1 Determinación de la actividad endoglucanasa empleando como sustrato carboximetilcelulosa .....	39
3.3.10.2 Determinación de la actividad endoglucanasa empleando como sustrato p-nitrofenil $\beta$ -D-Celobiósido.....	40
3.3.10.3 Determinación de la actividad exoglucanasa empleando como sustrato celulosa microcristalina.....	40
3.3.10.4 Determinación de la actividad exoglucanasa empleando como sustrato p-nitrofenil $\beta$ -D-Lactósido .....	41
3.3.10.5 Determinación de la actividad $\beta$ -Glucosidasa empleando p-nitrofenil $\beta$ -D-Glucopiranosido (pNGP).....	41
3.3.11 Caracterización mediante la determinación de la temperatura y pH óptimo .....	42

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Aislamiento de microorganismos a partir de materia vegetal en descomposición .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Determinación cualitativa de la actividad celulolítica.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Identificación del microorganismo.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.1 Determinación del género.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.2 Determinación de la especie .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4 Fermentación en sustrato sólido .....</b>	<b>50</b>
<b>4.5 Purificación de proteínas.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6 Caracterización de las enzimas .....</b>	<b>57</b>
<b>4.7 Discusión de resultados.....</b>	<b>59</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
<b>5.1 Conclusiones.....</b>	<b>67</b>
<b>5.2 Enfoque verde del proyecto .....</b>	<b>68</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>7. APÉNDICE 1 .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura	Página
1. Estructura Molecular de la Celulosa.....	3
2. Interacciones Estructurales entre la Celulosa, Hemicelulosa y Lignina. ....	5
3. Mecanismo de hidrólisis de la celulosa .....	10
4. Hongos filamentosos aislados de semillas de encino recolectadas en Los Ramones N.L.....	44
5. Prueba de actividad celulolítica en placa. ....	45
6. Gráfico comparativo de los distintos índices de potencia de los hongos aislados. ....	46
7. Análisis comparativo de las características macroscópicas y microscópicas del microorganismo aislado. ....	47
8. Electroforesis del fragmento amplificado por PCR del 5.8S RNA del hongo aislado .....	48
9. Actividad celulolítica del hongo <i>Cladosporium cladosporioides</i> sobre los diferentes sustratos lignocelulósicos durante el período de fermentación. ..	50
10. Actividad celulolítica del hongo <i>Aspergillus niger</i> sobre los diferentes sustratos lignocelulósicos durante el período de fermentación.....	51
11. Actividad celulolítica del hongo <i>Trametes trogii</i> sobre los diferentes sustratos lignocelulósicos durante el período de fermentación.....	52
12. Actividad celulolítica en función del crecimiento microbiano. ....	53
13. SDS-PAGE al 12% de extractos de <i>Aspergillus niger</i> y	

<i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	54
14. Elución de las proteínas sobre la columna de permeación en gel.....	55
15. Caracterización de las enzimas por temperatura.....	57
16. Caracterización de las enzimas por pH .....	57
17. Zimograma electroforético de las fracciones concentradas de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Cladosporium cladosporioides</i> resultantes de la fermentación.....	58
18. Zimograma de las fracciones de los concentrados enzimáticos de <i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> . ....	58
19. Zimograma de la $\beta$ -Glucosidasa. ....	59



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Algunos microorganismos productores de enzimas celulolíticas aislados del suelo y de materia vegetal en descomposición. ....	7
II. Microorganismos productores de distintas enzimas celulolíticas.....	17
III. Condiciones de la PCR para la amplificación de la región 5.8S RNA del microorganismo en estudio.....	29
IV. Preparaciones buffer utilizadas en la determinación del pH óptimo de la actividad catalítica de las enzimas producidas .....	42
V. Resultado del análisis filogenético del hongo aislado y su proximidad con otras especies.....	49
VI. Purificación de la Endoglucanasa.....	56
VII. Purificación de la Exoglucanasa .....	56
VIII. Purificación de la $\beta$ -Glucosidasa .....	56
IX. Comparación de las enzimas producidas con los reportes bibliográficos .....	65
X. Comparación de las enzimas celulolíticas producidas por diferentes organismos y sustratos.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grados Centígrados
Cd	Ciudad
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
Cm/hr	Centímetros por hora
CSD	Caldo Saboraud Dextrosa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3-5 Dinitrosalicílico
gds	Gramos de sustrato
gr	Gramos
HCl	Ácido Clorhídrico
IP	Índice de potencia
ITS	Espaciador Interno Transcrito
KDa	Kilo Daltons
Kg	Kilogramo
Lb/pulg <sup>2</sup>	libras sobre pulgada cuadrada
μl	microlitros
μm	Micrómetros
μM	Micro molar
mm	Milímetros
M	Molar
m <sup>2</sup>	Metros cuadrados
min	Minutos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidroxido de Sodio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Sodio
NCBI	National Center Biotechnology Information
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Amonio
nm	Nanómetros
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pb	Pares de bases
PDA	Agar Patata Dextrosa
pH	Potencial de hidrógeno
pNGP	<i>p</i> -Nitrofenil β-D Glucopiranósido
pNPC	<i>p</i> -Nitrofenil β-D Celobiósido
pNPL	<i>p</i> -Nitrofenil β-D Lactósido

<b>RF</b>	<b>Movilidad electroforética relativa</b>
<b>p/v</b>	<b>Relación peso volumen</b>
<b>RPM</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>
<b>S.A. de C.V.</b>	<b>Sociedad Anónima de Capital Variable</b>
<b>SDA</b>	<b>Agar Dextrosa Saboraud</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil Sulfato de Sodio</b>
<b>SmF</b>	<b>Fermentación sólida</b>
<b>SSF</b>	<b>Fermentación sumergida</b>
<b>TSNT</b>	<b>Buffer de lisis Tritón-SDS</b>
<b>UAMH</b>	<b>University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium</b>
<b>UI</b>	<b>Unidades enzimáticas</b>
<b>Uv/Vis</b>	<b>Ultravioleta visible</b>
<b>V</b>	<b>Volts</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

Las enzimas microbianas son uno de los productos biotecnológicos cuya obtención es de suma importancia, presenta ciertas ventajas económicas y técnicas ya que pueden producirse a gran escala con un rendimiento predecible, poseen potencial para catalizar un gran número de reacciones, además de que se puede tener disponibilidad continua de las mismas.

Las celulasas han atraído la atención mundial debido a sus numerosas aplicaciones, tales como la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, en la industria textil, la industria del papel, la formulación de alimentos para ganado, la clarificación de jugos de frutas y el procesamiento del almidón, entre otros. Sin embargo, la aplicación que más impacto ha generado es el uso de las enzimas para la degradación del material lignocelulósico para la obtención de azúcares fermentables que a su vez serán convertidos a etanol.

Los hongos filamentosos por su extensa variedad de especies y complejidad biológica, son capaces de sintetizar una gran variedad de compuestos de interés industrial, como antibióticos, enzimas y vitaminas, entre otros (Martinez-Ayala C., 2008). También se utilizan en procesos de la industria alimentaria como en la maduración de quesos y en el área ambiental se utilizan diferentes tipos de hongos para la degradación de contaminantes. Una de las ventajas de utilizar hongos filamentosos para la producción de algunos tipos de enzimas, es que gracias a su fisiología logran tolerar condiciones de crecimiento que muchas bacterias no resisten (Hafedh B. et al, 2001).

### **1.1 Estructura y función de la celulosa**

La celulosa es uno de los materiales más utilizados desde tiempos remotos, y en la actualidad es la fuente de combustibles orgánicos, compuestos químicos, fibras y materiales necesarios para cubrir necesidades humanas tales como el papel, la pulpa, las maderas, etc. (Ye Sun, Jia Yang, 2002). Se estima que alrededor de 180 billones de toneladas de celulosa son producidas por las plantas anualmente, por lo que constituye una de las fuentes de carbono renovables más importantes que hay sobre la tierra (Dunrad et al. 1984). La celulosa es un biopolímero lineal compuesto por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos tipo  $\beta$ -1,4. Los extremos del polímero son asimétricos, los que contienen el carbono anomérico (C1) libre de la molécula de glucosa pueden reducir a sustancias oxidantes (como el cobre), y se les conocen como extremos reductores. Mientras que el carbono 4 con un radical hidroxilo libre es el extremo no reductor (Kadla y Gilbert 2004).

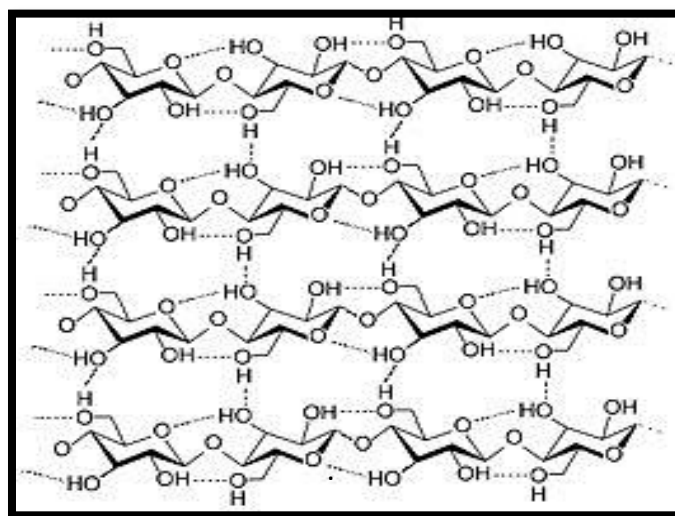


Figura 1. Estructura Molecular de la celulosa.

El arreglo de las moléculas de celulosa en la pared celular de las plantas es jerárquico. La configuración tridimensional es estabilizada mediante interacciones de Van der Waals, y consiste en 30 moléculas lineales, de entre 10,000 y 14,000 unidades de glucosa, que forman una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar la fibrilla de celulosa (Klemm, D. et al., 2005). Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Sarath et al, 2008).

Dentro de las fibras de celulosa se distinguen diferentes regiones que van desde las más organizadas (región cristalina) hasta las desordenadas (región amorfa). La característica cristalina de la celulosa se debe a que los componentes moleculares de las microfibrillas están organizados muy compactamente mediante puentes de hidrógeno (La Mantia, F. & M. Morreale, 2011). Usando difracción de rayos X se ha determinado que una unidad básica de celulosa cristalina (conocida como tipo I) está

formada por ocho moléculas de celobiosa (dímeros de glucosa) arregladas en capas de moléculas paralelas mediante interacciones débiles (inter e intramoleculares) entre los átomos de glucosas adyacentes. Esta cristalinidad, no muy común entre los polímeros, es lo que le confiere a la celulosa una gran estabilidad, por tal motivo su hidrólisis es muy compleja (Zugenmaier, P., 2008).

La naturaleza estructural de la celulosa cristalina la vuelve insoluble en la mayoría de los solventes incluyendo el agua, y evita que sea atacada por enzimas microbianas, a este fenómeno se le conoce como recalcitrancia. Las regiones menos ordenadas se conocen como celulosa para-cristalina, y las regiones amorfas están compuestas de estructuras secundarias, que se encuentran en menor proporción dentro del arreglo molecular de la celulosa, tales como microfibrillas en forma de rosca o vueltas, o regiones vacías que dan forma a microporos superficiales y capilares (Wilder, B. M. & Albersheim, 1973). Esta heterogeneidad hace que las fibras sean capaces de hincharse cuando están parcialmente hidratadas, dando como resultado que las cavidades y microporos se hagan lo suficientemente amplias para permitir la penetración de moléculas más grandes, desde nutrientes hasta enzimas.

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. A diferencia de la celulosa su estructura no es homogénea (Wilder, B. M. & Albersheim, 1973). Está formada por pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y p-cumárico), las hemicelulosas son polidispersas y altamente ramificadas, con sustituyentes de diferentes tipos (Bidlack, J. et al. 1992). La frecuencia y composición de las cadenas depende de cada especie vegetal en particular y del método con el que fueron extraídas.

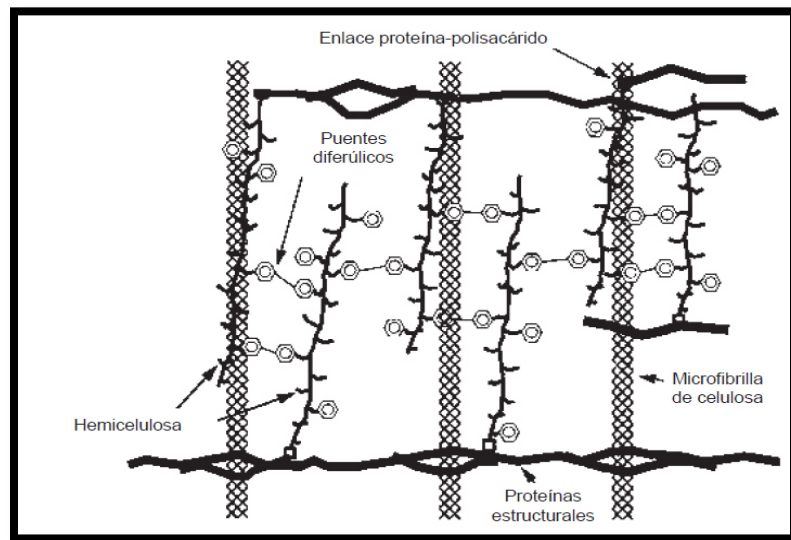


Figura 2. Interacciones estructurales entre la celulosa, hemicelulosa y lignina.  
(Modificado de Saha, 2003)

Se considera que las moléculas de hemicelulosa se encuentran altamente entrecruzadas mediante puentes diferúlicos formando una red en la que se encuentran embebidas las microfibrillas de celulosa, al tiempo que proteínas de la pared celular también forman puentes con el ácido ferúlico, dándole gran resistencia e insolubilidad



a toda la estructura (Bauer, W. D. et al. 1973). Estas propiedades, junto con la lignina, contribuyen a la elevada recalcitrancia de los materiales celulósicos.

## **1.2 Enzimas celulolíticas**

### **1.2.1 Microorganismos con capacidad de producir enzimas celulolíticas**

Los microorganismos con capacidad de producir enzimas con actividad celulolítica, son principalmente degradadores de carbohidratos y generalmente son incapaces de utilizar proteínas o lípidos como nutrientes para su crecimiento. Entre las bacterias que presentan actividad celulolítica destacan *Cellulomonas* y *Cytophaga* (Enoch Y. et al., 2011); sin embargo, los hongos son más utilizados, principalmente por su capacidad para utilizar distintos tipos de carbohidratos y no verse inhibidos por las concentraciones elevadas de otros azúcares en el medio (represión catabólica), como ocurre con las bacterias (Ali A. et al. 2011). Los hongos tienen más éxito que las bacterias en la hidrólisis de la celulosa presente en materiales de origen lignocelulósico, ya que poseen la capacidad de excretar celulasas que pueden ser aisladas del medio de cultivo así como del micelio. Las bacterias deslizantes y las mixobacterias no excretan celulasas al medio, pero se adhieren a las fibras de celulosa para digerirlas (Belghith H, et al. 2001).

En condiciones de aireación la hidrólisis de la celulosa es llevada a cabo por varios microorganismos aerobios que incluyen hongos filamentosos del género *Aspergillus* (Hussain A. et al. 2011) y bacterias del género *Bacillus* (Doi, 2007). Sin embargo, bajo condiciones anaerobias como en el rumen, la celulosa es atacada por bacterias del género *Clostridium* y unos pocos hongos anaeróbicos del grupo *Chytridiomycetes*.

Organismos con capacidad celulolítica				
Organismos eucarióticos				
Quitridiomycetos	Hongos mitosporicos	Ascomycetos	Basidiomycetos	
<i>Neocallimastix</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Coprinus</i>	
<i>Orpinomyces</i>	<i>Botrytis</i>		<i>Fomes</i>	
<i>Piromonas</i>	<i>Fusarium</i>		<i>Pleurotus</i>	
<i>Sphaeromonas</i>	<i>Humicola</i>		<i>Polyporus</i>	
	<i>Myrothecium</i>		<i>Trametes</i>	
	<i>Trichoderma</i>		<i>Rhizoctonia</i>	
Organismos procarióticos				
Mixobacterias	Bacterias deslizantes	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Actinomicetos
<i>Archangium</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Polyangium</i>	<i>Sporocytophaga</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Sorangium</i>			<i>Clostridium</i>	<i>Streptosporangium</i>
			<i>Eubacterium</i>	
			<i>Ruminococcus</i>	

Tabla I. Algunos microorganismos productores de enzimas celulolíticas aislados del suelo y de materia vegetal en descomposición.

La hidrólisis enzimática de la celulosa es catalizada por tres enzimas: la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa que hidroliza los enlaces  $\beta$ -1,4 en las regiones amorfas internas de la celulosa dando largos fragmentos solubles, la exo- $\beta$ -1,4-glucanasa que separa el disacárido celobiosa desde los extremos reductores de la molécula y la  $\beta$ -glucosidasa que lleva a cabo la hidrólisis de la celobiosa dando como producto moléculas de glucosa (Withers S. 2001).

Inicialmente, los sistemas celulolíticos que recibieron mayor atención fueron los de organismos productores de grandes cantidades de enzima, tales como *T. reesei* (Durand, 1984) y *Phanerochaete chrysosporium*, (Martínez D. *et al.* 2004) este último degrada la celulosa y hemicelulosa y es uno de los pocos basidiomicetos que se han utilizado como modelo para el estudio de la degradación de celulosa. Del análisis de la secuencia de su genoma se han determinado 240 enzimas que actúan sobre carbohidratos, de las cuales 40 son probables endoglucanasas, siete celobiohidrolasas y nueve  $\beta$ -glucosidasas. Actividad de sobre la celulosa amorfa y la cristalina y dos tipos de xilanos han sido observadas también en otros dos basidiomicetos que ocasionan pudrición blanca.

### **1.2.2 Mecanismo de acción de las celulasas**

Las celulasas son enzimas que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4- glucosídicos de la celulosa dando como productos primarios glucosa, celobiosa y celooligosacáridos. Están presentes en 13 de las 82 familias de glucosil-hidrolasas identificadas por análisis de secuenciación (Henrissat, B., Bairoch, A., 1993). Este grupo del sistema complejo de enzimas es el más ampliamente estudiado ya que comprende las endoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas.

Las celulasas son glicosil-hidrolasas, y utilizan dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales. Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición (mecanismo de retención) y otro tipo en el que se pierde la

posición (mecanismo de inversión) (Whiters, 2001). Las glicosil-hidrolasas se clasifican con base en su secuencia de aminoácidos. Este tipo de clasificación por familias, permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de acción y determinar las relaciones evolutivas entre ellas. De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos:

Endoglucanasa: Éstas son 1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4) que se agrupan en las familias 5, 6, 8, 9 y 12 principalmente, de las glicosil-hidrolasas. Las endoglucanasas actúan de forma azarosa sobre las regiones de celulosa amorfa en el interior del polisacárido, generando oligosacáridos de diferentes tamaños y por lo tanto, nuevas cadenas terminales.

Exoglucanasas: Producen principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor y están representadas por dos grupos de enzimas: exocelobiohidrolasas o celobiohidrolasas (CBH) (1,4- $\beta$ -D-glucancelobiohidrolasas) (EC 3.2.1.91) que liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor y exoglucohidrolasas (1,4- $\beta$ -D-glucan glucohidrolasas) (EC 3.2.1.74) que liberan unidades de glucosa a partir del extremo no reductor e incluyen también actividad de las celobiohidrolasas produciendo celobiosa por ataque en el extremo no reductor del polímero.

$\beta$ -Glucosidasas: ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21) hidrolizan celobiosa y otros  $\beta$ -1,4-oligoglucósidos de cadena corta para formar glucosa, siendo ésta el resultado final de la acción degradativa del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa.

Para la efectiva digestión de la celulosa las enzimas fúngicas han evolucionado mecanismos sinérgicos que les permiten contender con su recalcitrancia. Este fenómeno se refiere a que la actividad máxima de degradación de la celulosa no se lleva a cabo por enzimas individuales, sino por mezclas de tres o más enzimas (Linder & Teeri, 1996).

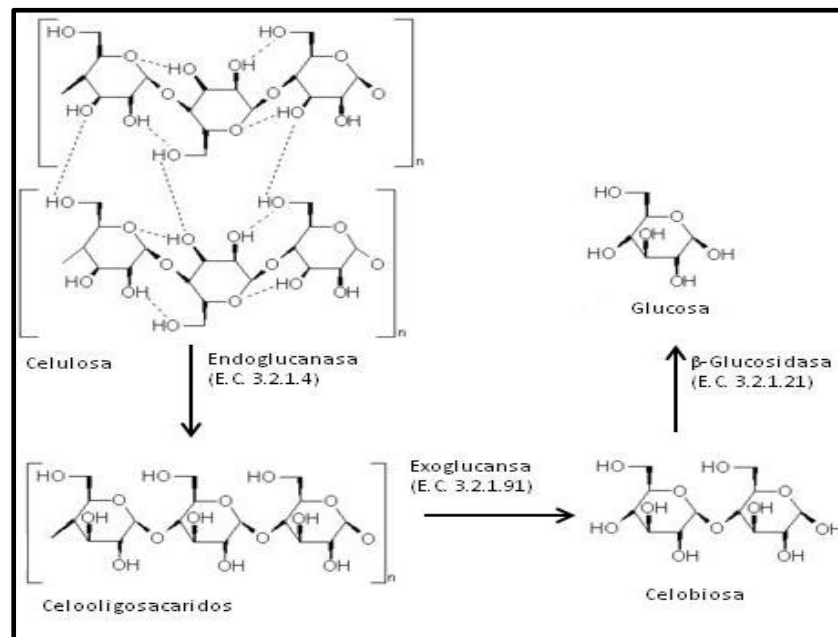


Figura 3. Mecanismo de hidrólisis de la celulosa

### 1.3 Aplicaciones de las enzimas celulolíticas

Las celulasas de origen microbiano tienen aplicaciones en una gran variedad de industrias, donde el grado de pureza puede variar según se requiera. Inicialmente se buscó su aplicación en la industria agrícola para mejorar alimentos para consumo animal, en la industria textil y de los detergentes, pero en los últimos años, en la búsqueda de nuevas alternativas para el aprovechamiento de materiales de desecho, son utilizadas en la producción de biocombustibles a partir de fuentes renovables, de bajo costo y que además generan menos emisiones (Bhat S, Bhat MK, 1997).

### **1.3.1 Industria textil**

Son el tercer grupo de enzimas utilizadas en este tipo de industria, y han encontrado su introducción en esta área en apenas una década. Se utilizan para dar el acabado final a prendas de mezclilla que utilizan un estilo “desgastado”. Anteriormente este proceso se llevaba a cabo utilizando pumicita (piedra pómez). La enzima actúa liberando el colorante índigo carmín para dar el acabado deseado. También se utiliza para eliminar ciertas fibras que se incrustan en las prendas durante el proceso (Miettinenoinonen, A.S.K. y Elovainio M.J.,1990).

### **1.3.2 Industria alimenticia**

Se utilizan en la clarificación de jugos de frutas y vegetales, así como en la producción de néctares y puré. En el proceso de malteado de la cebada, en la manufactura de la cerveza, se requiere el uso de glucanasas (Cinar I., 2005). Además son empleadas en la extracción de compuestos carotenoides, en la industria de los colorantes de origen vegetal, y en la extracción del aceite de oliva. También se adicionan a alimentos destinados al consumo animal, para mejorar su digestibilidad (Szijarto N., et al. 2004).

### **1.3.3 Industria del papel**

Inicialmente se consideraban indeseables, ya que la contaminación con microorganismos celulolíticos presentaba un problema que se traducía en grandes pérdidas de producto final. Sin embargo, hoy encuentran aplicaciones en esta industria en la que se utilizan para disminuir la resistencia del papel y aumentar la suavidad, como es el caso del papel sanitario y toallas para manos (Eriksson T y Olsson L.,2003).

#### **1.3.4 Biocombustibles**

En esta área se ha buscado que las celulasas tengan el mayor impacto posible, debido a la creciente demanda de fuentes alternativas de combustibles que sean renovables y generen menos emisiones (Bhat M.K.,1997). La producción mundial de bioetanol en 2010 fue de  $50 \times 10^9$  litros, lo que equivale a más de cuatro veces de lo que se produjo en 2007(Paredes Medina et al., 2010). Este aumento cubre solamente el 1% de las necesidades totales de combustible. Para contender con los grandes volúmenes de materiales lignocelulósicos requeridos en la producción de etanol a nivel industrial, son necesarias enzimas con altas actividades en diferentes condiciones de temperatura, salinidad y pH. Las celulasas actúan sobre residuos lignocelulósicos para después producir azúcares que puedan ser fermentables hasta etanol (Fujita Y., et al. 2002). Debido a que el proceso presenta mayor costo que la producción convencional, aún se buscan formas de optimizarlo para volverlo sustentable y económicamente rentable.

#### **1.4 Producción de enzimas celulolíticas**

En la actualidad, se están buscando enzimas que puedan cubrir las características específicas de eficiencia catalítica sobre sustratos celulósicos insolubles, además que tengan una buena estabilidad térmica y puedan tolerar mayores intervalos de pH sin afectar su actividad (Henrissat B. y Bairoch A., 1993).

Los cultivos en fase sólida son ampliamente recomendados para la producción de celulasas a nivel laboratorio, debido a que generan una menor dificultad al momento de separar la enzima del resto del medio en comparación con los cultivos sumergidos. Sin embargo, entre las desventajas que presenta este método para llevarlo

a cabo a escala industrial, se encuentran la corta vida de las columnas de fermentación y el elevado costo del diseño de las columnas así como el de su mantenimiento a gran escala (Himmel, M.E., et al. 2007).

A nivel industrial, los cultivos sumergidos siguen siendo hasta el día de hoy los más utilizados, a pesar de requerir una gran inversión para extraer y purificar las enzimas además de los costos de mantenimiento. No obstante, se están desarrollando nuevas alternativas para aplicar tecnologías que permitan aumentar la cantidad de enzima producida, utilizando métodos menos costosos (Blotkamp PJ, et al. 1978). Se modifican diversos parámetros de la fermentación, tales como el pH, temperatura, adición o remoción de ciertos precursores o inhibidores, con el fin de incrementar la efectividad en la producción de la enzima, o inclusive agregando otro tipo de microorganismo para que sinérgicamente puedan mejorar el rendimiento.

#### **1.4.1 Fermentación en fase sólida**

La característica esencial de la fermentación sólida es el crecimiento del microorganismo sobre un sustrato insoluble sin una fase libre, variando el nivel de humedad del 30 al 80% (Reeta R.S., et al. 2010). La fermentación en medio sólido ofrece una serie de ventajas sobre los procesos convencionales de fermentación sumergida para la obtención de productos de alto valor agregado como etanol, enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos, aminoácidos, pigmentos, metabolitos secundarios, entre otros, debido a los bajos niveles de humedad y a la disminución del volumen del medio por unidad de peso de sustrato, además de que se obtiene una alta productividad, los volúmenes de fermentación son menores a los



sistemas sumergidos y el tratamiento del efluente es reducido ( Wei-Cheng Sun, et al. 2008).

El sustrato debe contener sólo la humedad suficiente para favorecer el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo. Estos sustratos no son solubles en agua y constituyen las fuentes de carbono, vitaminas y minerales que favorecen el crecimiento microbiano. Los sustratos utilizados en este tipo de fermentación son muy variados, desde celulosa de alta cristalinidad hasta cereales como el trigo, centeno, arroz y maíz (Wei-Cheng Sun, et al. 2008).

También se usan desechos de la agroindustria como los residuos de manzana, plátano, uva, cítricos, caña de azúcar, entre otros, (Gurpeth S.D. et al., 2012) los cuales son considerados los mejores sustratos para fermentación en fase sólida ya que a pesar de su carácter residual, le proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, a un costo muy bajo (Oyeleke S.B. y Jibrin M.B., 2009).

El estudio de parámetros como la temperatura, aireación, humedad, agitación, tamaño de partícula, el diseño del reactor, etc., es fundamental para el éxito de la fermentación en fase sólida debido a que de ellos va a depender tanto el crecimiento del microorganismo como la formación del producto final.

#### **1.4.2 Tipos de reactores para una fermentación en fase sólida**

Dentro de los procesos de fermentación en medio sólido existen actualmente dos categorías: a escala laboratorio en la que se utilizan pequeñas cantidades de medio sólido hasta pocos kilogramos, (Hölker U, et al. 2004) y el otro que es a escala piloto y

escala industrial en donde se emplean desde kilogramos hasta toneladas. En la primera categoría existen muchos diseños de biorreactores, los cuales llegan a ser muy sofisticados, mientras que en la segunda categoría es poca la variedad, solo algunos de nivel industrial pueden operar en condiciones estériles (Reeta, et al. 2010).

Los tipos de biorreactores más estudiados han sido los de bandeja y los de tambor rotatorio y desde hace pocos años se ha introducido un nuevo tipo de biorreactores para fermentación en medio sólido denominados de *cama empacada* o *columna de lecho fijo*. Algunos de los biorreactores más utilizados a escala laboratorio son cajas petri y matraces Erlenmeyer. Éstos son utilizados por su simplicidad, no operan con aireación ni agitación forzada, en ellos solamente se controla la temperatura y la humedad en cuarto de incubación.

Una de las principales ventajas del proceso de obtención de enzimas celulolíticas mediante la fermentación en fase sólida, radica en la facilidad de la separación del producto de interés a partir del medio de cultivo, esto es posible gracias a que las enzimas son de carácter extracelular (Vintila T. et al., 2009). Se han diseñado reactores en los que una vez que se realizó la fermentación y se extrajo el complejo enzimático, se esterilizan nuevamente y se vuelven a inocular. Se ha comprobado que la biomasa residual del microorganismo también sirve como promotor del crecimiento de un inóculo fresco. La materia vegetal que sirve como inductor de la producción de enzimas celulolíticas puede ser utilizada en varias ocasiones, debido a que la fermentación se detiene antes de que el microorganismo degrade completamente el sustrato vegetal.

### 1.5 Antecedentes

En la actualidad, la búsqueda de microorganismos que sean capaces de sintetizar productos de interés biotecnológico es extensiva. La producción de enzimas genera un gran interés debido a su capacidad de catalizar una gran cantidad de reacciones y a su especificidad (Lin Y., Tanaka S., 2006). Se pueden utilizar en una gran variedad de procesos y son capaces de ejercer su función en condiciones extremas de temperatura y pH.

Las celulasas se caracterizan por ser un tipo de enzimas que en los últimos tiempos han adquirido una gran importancia, debido a su actividad específica sobre el material lignocelulósico (Mathew GM, et al. 2008). Se ha intentado aislarlas a partir de especies vegetales donde se han encontrado, como en el caso de las semillas de *Acanthocereus pitajaya* (pitaya amarilla) se lograron aislar distintos tipos de celulasas; sin embargo, la cantidad extraída de enzima era muy baja en comparación con los rendimientos obtenidos a partir de microorganismos (Dueñas y Sanchez et al. 2008).

Para la obtención de enzimas celulolíticas, se emplean principalmente los hongos filamentosos (Dashtban M, et al. 2009) ya que en comparación con otros organismos son los que mayor rendimiento han presentado debido a que por su complejidad metabólica son capaces de producir diversos tipos de enzimas celulolíticas, y organismos como algunas bacterias no son capaces de producir o bien las producen en muy baja cantidad (Tabla II). Uno de los microorganismos más estudiados es *Trichoderma reesei* que tiene la capacidad de producir glucosa a partir de celulosa nativa (Chahal, 1996). Sin embargo, a pesar de tener una gran capacidad para degradar

la celulosa a unidades de celooligosacáridos, se ha reportado que su producción de  $\beta$ -glucosidasa es baja. En respuesta a esta dificultad se han utilizado estrategias para compensar las deficiencias de *Trichoderma reesei* cultivándolo simultáneamente con el hongo *Aspergillus phoenicis*, del cual se ha reportado una alta producción de  $\beta$ -glucosidasa, incrementándose el rendimiento en la hidrólisis del material lignocelulósico (Zhiyou Wen, et al. 2005).

Organismo	Tipo	Enzimas Celulolíticas producidas	Referencia
<i>Clostridium thermocellum</i>	Bacteria	Cel8A, Cel5B,	Hansen et al.. 1992
<i>Cellulomonas flavigena</i>	Bacteria	Cel8A, Cel5B	Brumm Philip 2013
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	Cel7b,Cel 2 <sup>a</sup>	Yamada et al. 2012
<i>Trichoderma reesei</i>	Hongo (Deuteromycota)	Cel7b , Cel5a, Cel61a, Cel61b, Cel7a, Cel3a	Fatma et al. 2012
<i>Aspergillus niger</i>	Hongo (Deuteromycota)	Cel45a, Cel5a,Cel7b , Cel7a, Cel3a, Cbh2	Muhammad et al. 2009
<i>Trametes trogii</i>	Hongo (Basidiomycota)	Cel1a, Cel7b, Cel7b,Cel7a, Cel3a, Cbh2, Cel3a	Xu F. et al. 2012
<i>Linum usitatissimum</i>	Planta	Subunidad de la linamarasa	Brummel D. 2001

Tabla II. Microorganismos productores de distintas enzimas celulolíticas

La hidrólisis de la celulosa se lleva a cabo de una manera más eficiente cuando las endoglucanasas, exoglucanasa y  $\beta$ -Glucosidasas operan sinérgicamente, como ocurre en el celulosoma de *Clostridium thermocellum* (Zervlov V.V. et al. 2001). Los celulosomas funcionan como sistemas exocelulares que catalizan la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa. Está constituido por un polipéptido con un tamaño que oscila

entre 185 y 250KDa que no presenta actividad enzimática, denominado CipA, que se encuentra entre la célula y el sustrato al cual hidroliza (Aubert JP, 1994). Sin embargo, las condiciones de cultivo del microorganismo dificultan su aplicación a gran escala, además de que el microorganismo presenta inhibición del crecimiento cuando la concentración de carbohidratos en el medio de cultivo es muy elevada.

El estudio del genoma de hongos filamentosos capaces de producir enzimas celulolíticas, tales como *Trichoderma reesei* ha abierto la oportunidad de poder utilizar las herramientas moleculares para diseñar enzimas que puedan adaptarse a diferentes tipos de procesos. Se reportó que mediante una modificación en uno de los genes del hongo *Acidothermus cellulolyticus*, se logró incrementar un 20% su actividad sobre la celulosa microcristalina (Baker J.O. et al., 2005). También se han aislado, clonado y expresado en otros hongos los genes de *Trichoderma* y *Aspergillus*, para obtener una mejor combinación o sinergismo (Mantyla A, et al., 1998).

Otra línea que actualmente está en desarrollo es la utilización de celulosomas modificados que tengan la capacidad de producir enzimas de origen fúngico y bacteriano para que puedan ser expresadas en células procariotas, de las cuales se aprovecharía su rápido crecimiento para obtener una mayor productividad y un menor costo en el proceso de fermentación y extracción (Florence M., et al., 2007).

Debido al interés que se tiene por incrementar el rendimiento en la producción de celulasas de origen microbiano, se han diseñado distintos métodos para su obtención. El método convencional más utilizado es la fermentación sumergida (SmF). En la naturaleza la utilización de la celulosa por parte de los microorganismos se

asemeja más al procedimiento que ocurre en una fermentación en fase sólida (SSF) (Singhania R.R et al. 2007). Con base en esto, se ha experimentado con distintos tipos de hongos filamentosos que producen enzimas celulolíticas, entre los que destacan *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, y *Penicillium sp* (Belghith H., et al., 2001, Villena GK, y Gutiérrez-Correa M, 2007). Los resultados de la comparación entre la fermentación en fase sólida (SSF) y fermentación sumergida (SmF) demostraron que en la fermentación en fase sólida se obtuvo un rendimiento mayor que el logrado mediante una fermentación sumergida, además de que el costo de producción se disminuyó considerablemente (Reeta R.S. et al. , 2010).

El concepto de utilización de la celulosa como materia prima para la obtención de azúcares que puedan ser bioconvertidos a combustibles mediante el uso de microorganismos, ha retomado gran importancia debido a los altos costos del petróleo y la necesidad de utilizar fuentes que no afecten el abastecimiento agrícola para la industria alimenticia (Bhat MK y Bhat S, 1997). Las fuentes celulósicas potencialmente utilizables son los desechos de la industria maderera, agrícola y domésticos. Sin embargo, una variedad de pastos de crecimiento rápido podría ser una posibilidad más real mientras se mantienen en desarrollo nuevas tecnologías que permitan el uso de otros sustratos. Algunas de las especies de pastos de rápido crecimiento más estudiadas son: *Pennisetum virgatum*, *Pennisetum purpureum* y *Miscanthus giganteus* (Eriksson W. et al., 2008), este último originario del sur de Asia, y que da un rendimiento de  $7.41\text{kg/m}^2$ , además de tener capacidad de crecer en suelos poco fértiles, con poca disponibilidad de agua, y niveles altos de salinidad, ademásde

demostrar rendimientos de sacarificación de hasta 95% utilizando hidrólisis química seguida de una hidrólisis enzimática.

La búsqueda de microorganismos con capacidad de producir enzimas celulolíticas continúa siendo un área de investigación que se encuentra en constante desarrollo. Los procesos actuales para la producción y purificación de enzimas celulolíticas aún se mantienen con costos muy elevados, lo cual dificulta su aplicación en las diferentes industrias.

El presente trabajo se enfoca en la búsqueda de microorganismos con capacidad de producir cantidades competitivas de enzimas celulolíticas, y su posterior caracterización, así como en la búsqueda del aprovechamiento de materiales de desecho de la industria agrícola mediante el uso de residuos lignocelulósicos para la producción de las enzimas .

## **CAPÍTULO 2**

### **HIPÓTESIS, OBJETIVO Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **2.1 Hipótesis**

Los microorganismos nativos aislados de materia vegetal en descomposición tienen capacidad de producir diversos tipos de enzimas celulolíticas con potencial para degradar residuos lignocelulósicos.

#### **2.2 Objetivos**

Evaluar los métodos de producción y caracterizar las enzimas celulolíticas obtenidas de microorganismos aislados de materia vegetal, utilizando como sustrato un residuo lignocelulósico proveniente de la industria.

##### **2.2.1 Específicos**

1.- Aislar microorganismos presentes en materia vegetal con muestra de desarrollo microbiano.



- 2.-Evaluar la actividad celulolítica en placa de los hongos aislados y seleccionar el que haya mostrado mayor índice de potencia.
- 3.- Identificar el microorganismo a través de sus características morfológicas y genéticas.
- 4.- Producir las enzimas empleando el microorganismo seleccionado mediante una fermentación en fase sólida utilizando diferentes tipos de residuos agroindustriales.
- 5.- Seleccionar el residuo agroindustrial sobre el cual el microorganismo produzca una mayor actividad celulolítica.
- 6.-Separar, purificar y caracterizar las enzimas en términos fisicoquímicos y cinéticos.

### **2.3 Justificación**

En la búsqueda de fuentes alternativas de energía, que sean menos contaminantes, renovables y económicamente más accesibles, la obtención de azúcares fermentables necesarios para la producción biotecnológica de biocombustibles mediante hidrólisis enzimática de residuos provenientes de la agroindustria, resulta una opción económicamente accesible y ecológicamente amigable en comparación a los procesos convencionales.

## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Obtención de la muestra de materia vegetal para el aislamiento de microorganismos**

Los hongos a evaluar se aislaron a partir de semillas de Encino (*Quercus ilex*) con muestra evidente de desarrollo microbiano que se encontró de forma natural en la comunidad de Los Ramones, estado de Nuevo León, México.

Para su aislamiento se emplearon las medidas adecuadas de asepsia y esterilidad, así como para la obtención, procesamiento y manejo de las muestras, para asegurar que el origen de los microorganismos es el deseado y no producto de una contaminación, para lo cual se utilizaron materiales de uso común de laboratorio (pipetas y cajas de Petri estériles, guantes, agua estéril, entre otros).

### **3.1.2 Residuos lignocelulósicos para la evaluación de la producción de enzimas celulolíticas**

Pericarpio de Maíz: Fue proporcionado por la industria procesadora de maíz “Grupo MASECA S.A. de C.V.” como producto residual de la producción de harina de maíz para la elaboración de tortillas.

Residuos de Trigo: Fueron proporcionados por una industria procesadora de trigo para la producción de harinas “Molinera de México S.A. de C.V. “como producto residual de la producción de harina de trigo.

Residuos de Arroz: Fueron proporcionados por una industria procesadora de granos de arroz ubicada en Cd. Mante Tamaulipas.

## **3.2 Equipos**

### **Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, UANL:**

Campana de flujo laminar, microscopio óptico, incubadora, centrífuga, material de vidrio (matraces, cajas, tubos, vasos, pipetas, etc.), incubadora con agitación, estufa aireada, estufa de vacío, autoclave, balanza analítica, pH-metro, cámara de ultrafiltración, sistemas de filtración a vacío, sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida, sistema de cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de afinidad. Espectrofotómetro UV/Vis, baño seco de temperatura, lámpara de luz ultravioleta.

### **Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, UANL:**

Equipo para extracción de DNA genómico, equipo para electroforesis en geles de agarosa, transiluminador, termociclador, microcentrífuga, baño de temperatura.

## **3.3 Métodos**

### **3.3.1 Aislamiento de hongos filamentosos a partir de materia vegetal en descomposición.**

Se colocaron aproximadamente 5 g de semilla de encino en un matraz que contenía 100ml de NaCl 0.85% estéril. Posteriormente se llevó a cabo la técnica de dilución y siembra en placa, utilizando medio de cultivo PDA (o bien algún otro medio selectivo para hongos como el Medio Rosa de Bengala), para la obtención de cultivos puros a partir de las colonias aisladas.

### **3.3.2 Prueba de la actividad celulolítica en placa**

Para la evaluación cualitativa de la actividad celulolítica, se realizó una prueba en placa que contenía como medio de cultivo celulosa microcristalina al 1% y agar base al 2%. Se preparó un inóculo con una suspensión de esporas estandarizado a  $1 \times 10^6$  esporas/ml, asegurándose que el volumen de inóculo fuera lo suficientemente pequeño (100µl) para evitar que se extendiera por toda la placa, ya que era necesario observar el crecimiento del microorganismo en forma radial.

El cultivo se incubó a 28°C durante un período de 5 días, una vez que se observó que el crecimiento fue uniforme del centro a la periferia del agar, se agregó un agente

revelador (solución de lugol), distribuyendo homogéneamente por toda la superficie de la placa y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente y en una superficie plana. Transcurrido el tiempo, se observó un halo de hidrólisis alrededor de la colonia formada, el cual indica la actividad celulolítica del microorganismo en estudio. Finalmente se correlacionó el crecimiento del microorganismo en el medio del cultivo con su capacidad de hidrolizarlo, mediante la determinación del índice de potencia (IP), el cual se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Potencia} = 1 - \frac{\text{Diámetro de crecimiento (mm)}}{\text{Diámetro de hidrólisis (mm)}} \quad (1)$$

Esta prueba fue útil porque nos permitió identificar cuando un microorganismo puede ser potencialmente utilizado para la producción de enzimas celulolíticas, ya que al crecer sobre dicho medio que tiene como única fuente de carbono celulosa cristalina, indica que es capaz de degradar dicho sustrato para poder desarrollarse.

### **3.3.3 Caracterización del microorganismo seleccionado**

#### **3.3.3.1 Determinación de las características macroscópicas**

Se realizó una siembra por rasgadura en placa de agar para determinar las características morfológicas del microorganismo, como son la apariencia de las colonias, pigmento, textura, color del anverso y reverso, topología, entre otras, que pudieran dar una idea del tipo de microorganismo que se trata.

#### **3.3.3.2 Determinación de las características microscópicas**

Para determinar las características microscópicas, se realizó una preparación en fresco con azul de lactofenol para observar la morfología de las estructuras celulares características de los hongos (micelio, hifas, esporangios, esporas, etc.) y, posteriormente, se preparó un microcultivo de Henrici para apreciar con mayor detalle las características del microorganismo.

#### **3.3.3.3 Caracterización molecular del microorganismo seleccionado**

Para la identificación molecular de hongos se realizó un análisis de la secuencia de la región del espaciador interno transcrito (ITS) 1 y 2 del 5.8S RNA ribosomal. Se analizó esta secuencia debido a que es una región muy conservada y, para la identificación de hongos, es la que se utiliza más comúnmente (Travis H., et al., 2000). Para analizar esta secuencia fue necesario extraer previamente el DNA genómico del hongo, y posteriormente amplificar esta región.

### **3.3.3.3.1 Extracción del DNA genómico del hongo filamentoso**

Previamente a la extracción del DNA genómico, fue necesario realizar un pretratamiento a la biomasa fúngica, debido a que la composición de su pared celular dificulta la extracción por métodos convencionales (Martinez D., et al. 2004), recurriendo a una combinación de métodos utilizando lisis química (TSNT) con lisis mecánica (maceración).

La biomasa para la extracción del DNA genómico se preparó inoculando 3 ml de esporas del hongo a partir de una preparación estandarizada con  $1 \times 10^6$  esporas/ml en 150 ml de Caldo Saboraud-Dextrosa (CSD) previamente esterilizado. El cultivo se incubó a 28 °C grados por 48 h.

Para la extracción, la biomasa se colocó en un mortero y se le adicionaron 2 ml de buffer TSNT y 10 ml de nitrógeno líquido. Una vez congelada, la biomasa se maceró vigorosamente, agregando eventualmente más nitrógeno líquido para evitar la descongelación.

El macerado fue transferido a tubos de 1.5ml con perlas de vidrio de 0.5mm de diámetro para realizar una lisis mecánica adicional, y se colocaron en el vórtex durante 30 segundos.

Finalmente, la extracción y purificación del DNA genómico de la muestra se llevó a cabo mediante el protocolo marcado en el Kit Dneasy® Blood&Tissue de QIAGEN®.

### 3.3.3.3.2 Amplificación y secuenciación del ITS 5.8S RNA del microorganismo

Una vez obtenido el DNA genómico del microorganismo, se llevó a cabo la amplificación del ITS 5.8S RNA, para ello se utilizaron los siguientes primers:

Forward Primer: ITS 1 (3'-5')

TCCGTAGGTGAACCTGCGG

Reverse Primer: ITS 2 (5'-3')

GCTGCGTTCTTCATCGATGC

La mezcla de reacción para la amplificación por PCR se preparó como se indica en la tabla III.

Reactivo	Concentración	Cantidad
<i>Template DNA</i>	3268ng/μl	20μl
<i>Foward Primer (ITS 1)</i>	20 pM	3 μl
<i>Reverse Primer (ITS 2)</i>	20 pM	3μl
<i>dNTP's</i>	10 mM	1.5 μl
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	25mM	4 μl
<i>Taq polimerasa</i>	5U/ μl	0.5 μl
<i>Buffer</i>	10x	10 μl
<i>Agua MiliQ</i>	-----	9 μl

Tabla III. Condiciones de la PCR para la amplificación de la región 5.8S RNA del microorganismo en estudio

En el termociclador se programó un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos; 40 ciclos de:desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, alineación a 53°C durante 1 minuto y 1.2 minutos a 72°C; un ciclo de elongación final por 5 minutos a 72°C.



Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la pureza del producto amplificado y posteriormente se envió para su secuenciación a los laboratorios Geospiza ubicados en Seattle, Estados Unidos.

La secuencia obtenida se analizó en la base de datos de la NCBI, y comparó el patrón de alineamiento y porcentaje de homología utilizando la plataforma BLAST®, con los algoritmos *blastn*, *megablast* y *discontiguous megablast*.

### **3.3.4 Producción de enzimas celulolíticas**

#### **3.3.4.1 Estandarización de inóculos**

Para los objetivos del trabajo, se utilizaron 2 microorganismos de colección de los cuales se tienen reportes de producción de enzimas celulolíticas, el hongo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9142 y el basidiomiceto *Trametes trogii* UAMH 8156.

Para la estandarización de los inóculos de *Aspergillus niger* y del hongo en estudio, se realizó una suspensión de esporas. Para ello se utilizaron cultivos de 5 días en tubos con PDA a los cuales se les agregó 1 ml de solución de NaCl 0.85% y con el asa se removi6 la mayor cantidad de esporas, para posteriormente transferirlas a un tubo que contenía 9ml de solución de NaCl 0.85%. Se realizó el conteo de esporas utilizando una cámara de Neubauer y se calculó la cantidad de esporas por mililitro de solución salina. Debido a que *Trametes trogii* es un basidiomiceto, no produce esporas asexuales como *Aspergillus niger*, para la preparación del in6culo se utilizó la biomasa. Para la estandarización, se tomó una fracción de 1 cm<sup>2</sup> del microorganismo previamente

crecido en una placa de agar con medio Saboraud-Dextrosa (SDA) y se transfirió a un homogeneizador para fraccionar el micelio lo más posible. Posteriormente se agregó la biomasa homogenizada a un matraz Erlenmeyer que contenía 100ml de caldo Saboraud-Dextrosa, se dejó incubar a 28°C durante 5 días a 200 rpm.

Posterior al crecimiento se tomó una alícuota de 1ml del caldo con crecimiento microbiano, se centrifugó y se llevó a peso constante para conocer la cantidad de biomasa presente en ese cultivo por ml.

#### **3.3.4.2 Condiciones de la fermentación en sustrato sólido**

La fermentación en fase sólida se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y realizando dos réplicas de cada una de las fermentaciones realizadas.

Para la cascarilla de arroz y el pericarpio de maíz, se emplearon 10g del material lignocelulósico, libre de polvo y otros residuos que pudieran causar interferencia sin reducir su tamaño de partícula original. Para la cascarilla de trigo se agregaron únicamente 5 gramos, debido que al ajustar la humedad, presentó una hidratación mayor a la de los demás sustratos utilizados y por consecuencia aumentó su volumen, impidiendo la correcta difusión de oxígeno en el sistema y dificultando así el crecimiento de los microorganismos.

Previo a la fermentación, el pericarpio de maíz se sometió a un proceso para eliminar el almidón presente y así evitar que el microorganismo utilizara el almidón como fuente de carbono y no la celulosa presente en el pericarpio. El pretratamiento

consistió en someter la biomasa vegetal a 4 ciclos de altas presiones (25lb/pulg<sup>2</sup>) y temperaturas (140°C) durante 1 hora para solubilizar la mayor cantidad de almidón que pudiera encontrarse adsorbido en la biomasa, seguido de lavados con agua destilada. Al final de los ciclos y los lavados, se comprobó que el almidón se hubiera removido completamente realizando una prueba con lugol. Una vez que los diferentes sustratos se colocaron en los matraces, se añadieron 5ml de buffer de fosfatos pH=6 y se procedió a esterilizarlos a 15lb/pulg<sup>2</sup> a 121°C durante 15 minutos.

Se inocularon los matraces con cultivos de *Aspergillus niger* ATCC 9142, ajustando a través de una suspensión de esporas a  $1 \times 10^6$  esporas por matraz y *Trametes trogii* UAMH 8156 a 1 gramo de biomasa por matraz. Se fijó la humedad inicial a 0.6ml/g de biomasa vegetal agregando Buffer de Fosfatos pH=6 previamente esterilizado, para posteriormente incubarse a 28°C durante un periodo de 18 días. Durante el tiempo que dura la fermentación, se mantuvieron controladas la humedad y la temperatura, debido a que la humedad se perdía rápidamente durante los primeros días de la fermentación, para ello se adicionó buffer de fosfatos pH=6 a aquellos matraces que mostraban una pérdida significativa de la humedad.

#### **3.3.4.3 Monitoreo de la producción de enzimas celulolíticas en función del crecimiento microbiano.**

Para la determinación del crecimiento del microorganismo y la determinación de la actividad celulolítica durante el periodo de fermentación, se llevó a cabo un análisis por peso seco de la biomasa. Se preparó una serie de 32 matraces como se describe en

la sección 3.3.4.2. Se analizaron dos matraces cada dos días hasta completar los 18 días que dura la fermentación, para la determinación del peso seco y dos para la determinación de la actividad celulolítica. Para la determinación del crecimiento del microorganismo por peso seco, se extrajeron dos matraces del tiempo indicado y se llevaron a peso constante en una estufa de vacío a 80°C durante 18 horas para determinar la diferencia de peso de la biomasa original y la biomasa en la fermentación. Previo a esto, los matraces a analizar se tararon y se consideró un control negativo para asegurar la linealidad de los datos.

Para llevar a cabo el análisis de la actividad celulolítica se tomaron simultáneamente otra serie de dos matraces del tiempo correspondiente a los cuales se les realizó la extracción del concentrado enzimático como se indica en la sección 3.3.5 y se analizaron determinando la actividad celulolítica sobre carboximetilcelulosa como se indica en la sección 3.3.10.1.

### **3.3.5 Extracción y purificación del concentrado enzimático**

Por su carácter extracelular, la extracción de las enzimas se vio facilitada al concluir el tiempo de fermentación. Se adicionaron 30 ml buffer de fosfatos de pH 6 y se homogeneizó por agitación intermitente hasta que todo el material lignocelulósico quedó suspendido. Posteriormente se llevó a agitación constante a 150 rpm durante 15 minutos, para después decantar el sobrenadante y se realizaron 2 lavados adicionales con 10 ml de buffer para recuperar la mayor cantidad de enzimas.

Una vez obtenido el extracto, se sometió a una serie de filtraciones a vacío, con el objetivo de eliminar el exceso de partículas que pudieran interferir los análisis posteriores. Inicialmente se filtró con papel filtro Whatman del No.1, posteriormente se volvieron a filtrar, esta vez con filtros de fibra de vidrio con tamaño de poro de 1.6µm y filtros de celulosa regenerada de 0.4µm respectivamente.

### **3.3.6 Purificación de la fracción soluble (salting out)**

Se agregaron 30ml de una solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 30% p/v, por cada 100ml de solución a concentrar, se mezclaron bien y posteriormente se centrifugaron a 5000rpm durante 20 min. Se recuperó el precipitado y el sobrenadante se lavó con 30 ml de cada 100 ml de solución a concentrar, con una solución 10% más concentrada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (se realizaron lavados aumentando 10% la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por cada lavado, hasta alcanzar una concentración del 60%). El precipitado obtenido se resuspendió en 30ml de una solución buffer de acetato 100mM pH 4.8. Posteriormente se realizó una diálisis, agregando dentro de la membrana 10 ml de la solución con proteína resuspendida y se sumergió la membrana de diálisis en un vaso de precipitados que contenía 150 ml de buffer de acetato 20mM y pH 5.

Para optimizar la diálisis y evitar la saturación de la solución buffer, se cambió la cantidad de buffer en la que estaba sumergida la membrana de diálisis cada 2 horas. Para confirmar que ya no había presencia del agente precipitante, se realizó una prueba añadiendo gotas de nitrato de bario 1M a la solución resultante.

Las fracciones solubles obtenidas se concentraron por ultrafiltración hasta un décimo de su volumen inicial. Para ello, se depositaron los 30ml de la solución resultante de la diálisis, dentro de una cámara de ultrafiltración con una membrana de 10kDa, manteniendo una temperatura de 4°C. Los sólidos retenidos en la membrana se resuspendieron en 5ml de buffer de acetatos pH 4.8. Para lograr una concentración mayor, se utilizaron unidades de ultrafiltración por centrifugación, agregando 5ml del concentrado enzimático en la celda de ultrafiltración y centrifugando a 4500 rpm durante 15 minutos.

### **3.3.7Cromatografía de permeación en gel**

Para la separación de las diferentes fracciones proteicas por tamaño, se implementó un sistema de cromatografía de permeación en gel empleando una resina de poliacrilamida Biogel P-100® de BIO-RAD® con un rango de fraccionamiento de 5-a 100 KDa.

Se empacó una columna de la serie Glass Econo Column® de BIO-RAD® con 50ml de la resina, previamente preparada bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. Se dejó sedimentar durante 2 horas, para después conectar al sistema flujo en la cual se dejó estabilizar la columna hasta haber eluido 150 ml de fase móvil. Se utilizó buffer de acetato 100mM pH 4.8 como fase móvil. Las condiciones de flujo se fijaron a 0.16ml/min con un índice de migración de 5cm/hr colectando 1 ml por fracción. El volumen de muestra eluido en la columna fue de 1ml. En todas las fracciones colectadas, se determinó el contenido de proteína (Bradford, 1976) y actividad enzimática (Sección 3.3.10) para cada enzima.

### **3.3.8 Separación electroforética de las muestras concentradas**

Con la finalidad de determinar el peso molecular de las proteínas, se realizó una separación electroforética de las muestras concentradas, para lo cual se montó un sistema discontinuo de electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, con diferentes de concentraciones de acrilamida que varían del 6 al 12%, en condiciones desnaturalizantes.

Para tal objetivo se prepararon diferentes muestras agregando 5µl de muestra y 10µl de buffer de muestra, se mezclaron bien y se sometió a calentamiento a 90°C durante 5 minutos para asegurar la correcta desnaturalización de proteínas. Posteriormente se agregaron las muestras al gel, además de 10 µl de marcador de peso molecular (Bio-Rad Pre stained protein standards 10-250KDa), el cual ya viene listo para utilizarse. Una vez preparadas las muestras, los geles se colocaron y ajustaron dentro de la cámara de electroforesis. Posteriormente se adicionó el buffer de corrida para proceder a efectuar la electroforesis a manteniendo un voltaje constante de 200V durante 45-60min.

La detección de las bandas de proteína en los geles se realizó mediante tinción del gel con azul de Coomassie y el exceso de colorante fue removido lavando con agitación durante 30 minutos con una solución de desteñido (ver apéndice 4). Para la estimación del peso molecular de las proteínas en estudio, se realizó la metodología descrita en la sección 3.3.9.1.

### **3.3.9 Caracterización de las enzimas por peso molecular**

Para la determinación del patrón electroforético de la endoglucanasa, se preparó un gel de poliacrilamida a una concentración del 12% conteniendo carboximetilcelulosa al 0.04%. Las muestras se colocaron en el gel habiéndose mezclado previamente con buffer de dilución con SDS pero sin  $\beta$ -Mercaptoetanol ni calentamiento, debido a que se deseaba que la actividad celulolítica pudiera reestablecerse una vez terminada la electroforesis. Al concluir la electroforesis, se removió el exceso de SDS realizando dos lavados con 50ml cada uno con una solución de Tween 80 al 1% y agitación a 150 rpm durante 30 minutos. Para favorecer la hidrólisis del sustrato en el gel, posterior a los lavados, se incubó a 40°C durante 30 minutos. Para revelar las bandas de hidrólisis el gel se sumergió en una solución de Rojo Congo y se dejó teñir por 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de colorante se eliminó realizando un lavado con una solución de NaCl 1M y se observaron las bandas de hidrólisis como una zona libre de colorante en el gel.

Para evidenciar la presencia de la actividad Exoglucanasa y  $\beta$ -Glucosidasa se adicionaron al gel como sustratos el 4-Metilumberilferil Celobiósido y el 4-Metiluberilferil Glucopiranosido respectivamente a una concentración del 0.02% de la composición total del gel.

Al hidrolizarse estos sustratos por acción enzimática emiten luminiscencia en presencia de luz UV, lo que permite observar las bandas de hidrólisis directamente en el gel, sin necesidad de agregar ningún agente revelador adicional. Al concluir la



electroforesis, se lavaron los geles dos veces con 50ml de una solución de Tween 80 al 1% durante 30 minutos cada uno con la finalidad de remover el SDS excedente. Para favorecer la hidrólisis del sustrato en el gel, se incubaron a 50°C durante 15 minutos. Para observar las bandas luminiscentes fue necesario exponer el gel a la luz ultravioleta a longitud de onda de 365nm.

#### **3.3.9.1 Cálculo del peso molecular de las proteínas**

El cálculo del peso molecular se obtuvo mediante una serie de mediciones y cálculos en función del patrón de migración de las proteínas observado en el gel, para ello se construyó una curva de calibración graficando la movilidad electroforética relativa (RF) contra el logaritmo del peso molecular de cada una de las proteínas del marcador utilizado. El RF se obtiene dividiendo la distancia recorrida por las proteínas en el gel sobre la distancia de migración del colorante en la base del gel separador.

Para calcular el RF se midió la zona donde el gel separador inicia, hasta la parte inferior donde el colorante del buffer de carga se situó en la base del gel al detener la electroforesis. Posteriormente se toma la medida de la parte superior del gel separador hasta donde migró cada una de las bandas del marcador de peso molecular. A partir de la curva de calibración, se obtiene la ecuación de la recta y se calcula el peso molecular de las bandas a analizar.

### **3.3.9.2 Técnica del fraccionamiento de geles de poliacrilamida**

Para trazar el perfil electroforético de las enzimas obtenidas, se empleó la técnica del fraccionamiento de los geles. La técnica consistió en cortar el gel de poliacrilamida cada 2 mm a partir de la zona inferior donde finalizó la electroforesis. Estas fracciones se colocaron en un tubo de ensayo, conteniendo 1ml de buffer de acetato de sodio 50mM a un pH 4.8. Los tubos se dejaron en refrigeración por 24 horas de tal modo que la enzima atrapada en el gel de acrilamida difundiera al buffer. Luego de esta operación, se tuvieron las fracciones con las enzimas en solución, las que fueron analizadas para todas las actividades enzimáticas que se requirieron.

### **3.3.10 Caracterización mediante la determinación de actividad enzimática**

#### **3.3.10.1 Determinación de la actividad endoglucanasa empleando como sustrato carboximetilcelulosa**

Para la determinación de la actividad endoglucanasa, se preparó una solución de carboximetilcelulosa al 1%(Sigma- Aldrich) y una solución de buffer de citrato-fosfato 0.1M pH 6. Se colocaron en tubos de ensayo, 1ml de la solución de carboximetilcelulosa, 0.5ml de solución buffer de citrato-fosfato y 0.5ml de extracto clarificado de enzima. La mezcla se incubó a una temperatura de 39°C durante 15 minutos, y se finalizó la reacción agregando 3ml de reactivo de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) y llevando a baño de enfriamiento con hielo. Después se llevó a ebullición por exactamente 5 minutos, e inmediatamente después se enfriaron en baño con hielo. Se midió la absorbancia a 540 nm. Previamente se realizó una curva

estándar de glucosa para calcular la cantidad de azúcares reductores liberados en la reacción.

Se cuantificó la formación de azúcares reductores liberados en 15 minutos de reacción. Se llevó un blanco del clarificado para eliminar la absorbancia que se pudiera generar por la presencia de azúcares reductores libres formados durante la degradación del material celulósico por el desarrollo del microorganismo.

#### **3.3.10.2 Determinación de la actividad endoglucanasa empleando como sustrato *p*-nitrofenil $\beta$ -D-Celobiósido (pNPC)**

Se preparó una solución 1mM de *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-Celobiósido (pNPC), en buffer de acetatos 0.2M pH 4.8. Se agregaron 100 $\mu$ l de sustrato y 50 $\mu$ l de concentrado enzimático previamente incubados a una temperatura de 40°C durante 10 minutos. Se llevó a cabo la reacción durante exactamente 15 minutos y se agregó 1ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2M para finalizar la reacción y se incubó en baño de hielo. Se leyó la absorbancia a 412 nm y se determinó la cantidad de *p*-nitrofenol liberado mediante la realización previa de una curva estándar de *p*-nitrofenol en un intervalo de 100-500 $\mu$ M.

#### **3.3.10.3 Determinación de la actividad exoglucanasa empleando como sustrato celulosa microcristalina**

Se preparó una solución de celulosa microcristalina al 1% y se utilizó el mismo buffer de la determinación anterior (buffer de acetato pH 4.8). Se agregó 0.5ml de solución buffer, 1ml de solución de celulosa y 0.5ml de extracto clarificado. Se incubaron a 39°C

durante 120 minutos. Posteriormente se llevaron a ebullición durante 10 minutos para detener la reacción. Se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 minutos. Al sobrenadante se le adicionó 1 ml de agua destilada y se mezcló con 3 ml de reactivo de DNS, para llevarse a ebullición por exactamente 5 minutos. Concluido dicho tiempo, se enfriaron los tubos de reacción y se leyó la absorbancia a 540 nm. Se realizó una curva estándar de glucosa y se evaluó la formación de azúcares reductores liberados en 120 minutos.

#### **3.3.10.4 Determinación de la actividad exoglucanasa empleando como sustrato *p*-nitrofenil $\beta$ -D-Lactósido (pNPL)**

Se preparó una solución 1 mM de *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-Lactósido (pNPL), en buffer de acetatos 0.2 M pH 4.8. Se agregaron 100  $\mu$ l de sustrato y 50  $\mu$ l de concentrado enzimático previamente incubados a una temperatura de 45°C durante 10 minutos. Se llevó a cabo la reacción durante exactamente 30 minutos y se agregó 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M para finalizar la reacción y se incubó en baño de hielo. Se leyó la absorbancia a 412 nm y se calculó la cantidad de *p*-nitrofenol liberado mediante la realización previa de una curva estándar de *p*-nitrofenol en un intervalo de 100-500  $\mu$ M.

#### **3.3.10.5 Determinación de la actividad $\beta$ -Glucosidasa empleando *p*-nitrofenil $\beta$ -D-Glucopiranósido (pNGP)**

Se preparó una solución 1 mM de *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-Glucopiranósido (pNGP) en buffer de acetato 0.2 M pH 4.8. Se agregaron 100  $\mu$ l de sustrato y 50  $\mu$ l de concentrado enzimático previamente incubados a una temperatura de 50°C durante 10 minutos. Se llevó a cabo la reacción durante exactamente 10 minutos y se agregó 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M para

finalizar la reacción y se incubó en baño de hielo. Se leyó la absorbancia a 412 nm y se determinó la cantidad de *p*-nitrofenol liberado mediante la realización previa de una curva estándar de *p*-nitrofenol en un intervalo de 100-500µM.

### 3.3.11 Caracterización mediante la determinación de la temperatura y pH óptimo

Para la determinación de la temperatura y pH óptimos, se llevó a cabo un ensayo de actividad para cada tipo de enzima, utilizando únicamente los métodos ya descritos con pNPC para la endoglucanasa, pNPL para la exoglucanasa y pNGP para la β-Glucosidasa, respectivamente, con variaciones en la temperatura y en el tipo de buffer de reacción. En el caso de la determinación de la temperatura óptima la reacción se llevó a cabo en un intervalo de 20°C a 60°C, variando 5°C entre cada ensayo.

Para la determinación del pH donde se encuentra la mayor actividad catalítica, se substituyó el buffer de acetato pH 4.8 100mM usado originalmente, por distintos tipos de buffers con un intervalo de pH de 2-9, variando 0.5 unidades por cada ensayo, para evaluar la actividad de las enzimas en diferentes condiciones de pH.

BUFFER	CONCENTRACION	RANGO DE pH
Glicina-HCl	100mM	2 - 3.6
Acetato	100mM	3.7 - 5
Fosfato	100mM	5.1 - 8.1
Boratos	100mM	8.2 - 9

Tabla IV. Preparaciones buffer utilizadas en la determinación del pH óptimo de la actividad catalítica de las enzimas producidas

Se prepararon las soluciones a los diferentes pH y posteriormente se disolvieron los sustratos específicos para cada enzima en cada uno de las soluciones buffer preparadas y llevaron a cabo los ensayos a la temperatura de 50°C.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Aislamiento de microorganismos a partir de materia vegetal en descomposición

Mediante la técnica de dilución y siembra en placa se obtuvieron cultivos puros de las colonias aisladas de los microorganismos presentes en la materia vegetal. Se logró aislar 10 hongos filamentosos (figura 4), cuyas características macroscópicas permitieron diferenciarlos y, posteriormente, probar si presentan actividad celulolítica.

A cada uno se le identificó con la letra “H” y un número.

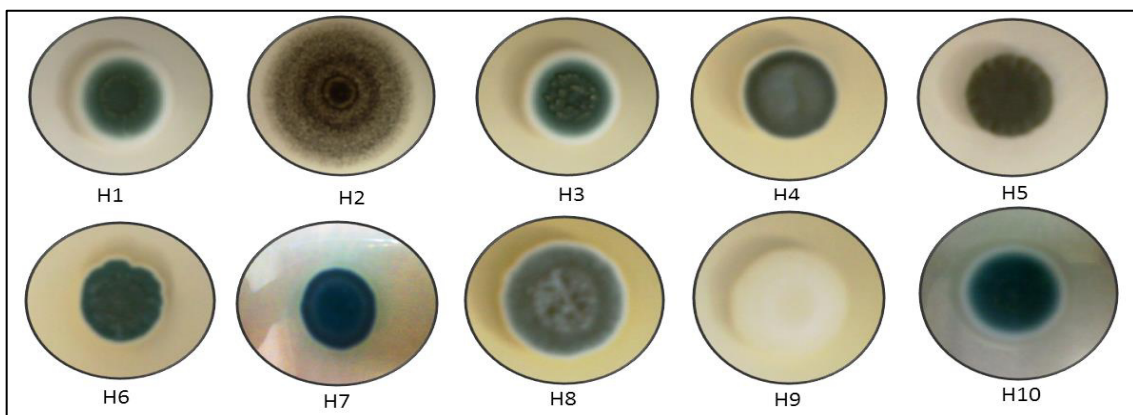


Figura 4. Hongos filamentosos aislados de semillas de encino recolectadas en Los Ramones N.L.

#### 4.2 Determinación cualitativa de la actividad celulolítica

Todos los hongos inoculados mostraron desarrollo en el medio de cultivo, aunque en diferente proporción; sin embargo, no todos hidrolizaron la celulosa, tal es el caso de los hongos H4 y H7. El resto de los hongos presentaron halo de hidrólisis, siendo más marcado en los hongos H5, H6 y H10 (figura 5).

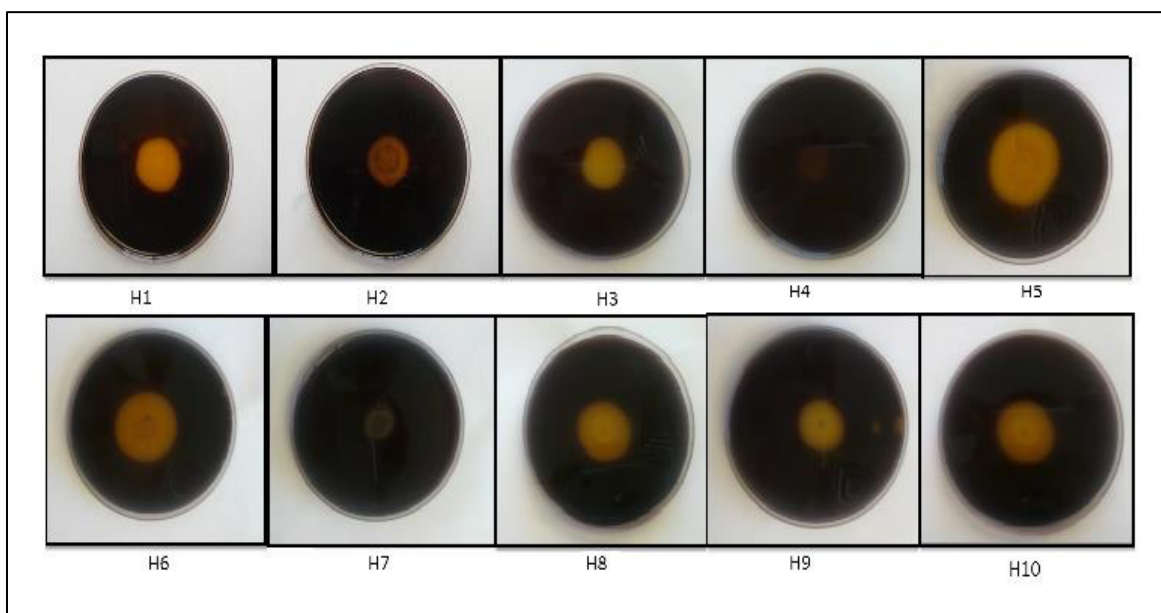


Figura 5. Prueba de actividad celulolítica en placa.

Después del revelado, se midió el diámetro de los halos de crecimiento y de hidrólisis en las placas respectivas para obtener el IP (Fórmula 1). H5 fue el que mostró un mayor valor de IP, seguido por H1. H6, H8, H9 y H10 presentaron IP's similares. H2 y H3 fueron los que presentaron menor halo de hidrólisis en la placa. En la figura 6 se puede apreciar claramente el comportamiento de cada uno de los hongos en la hidrólisis del sustrato.



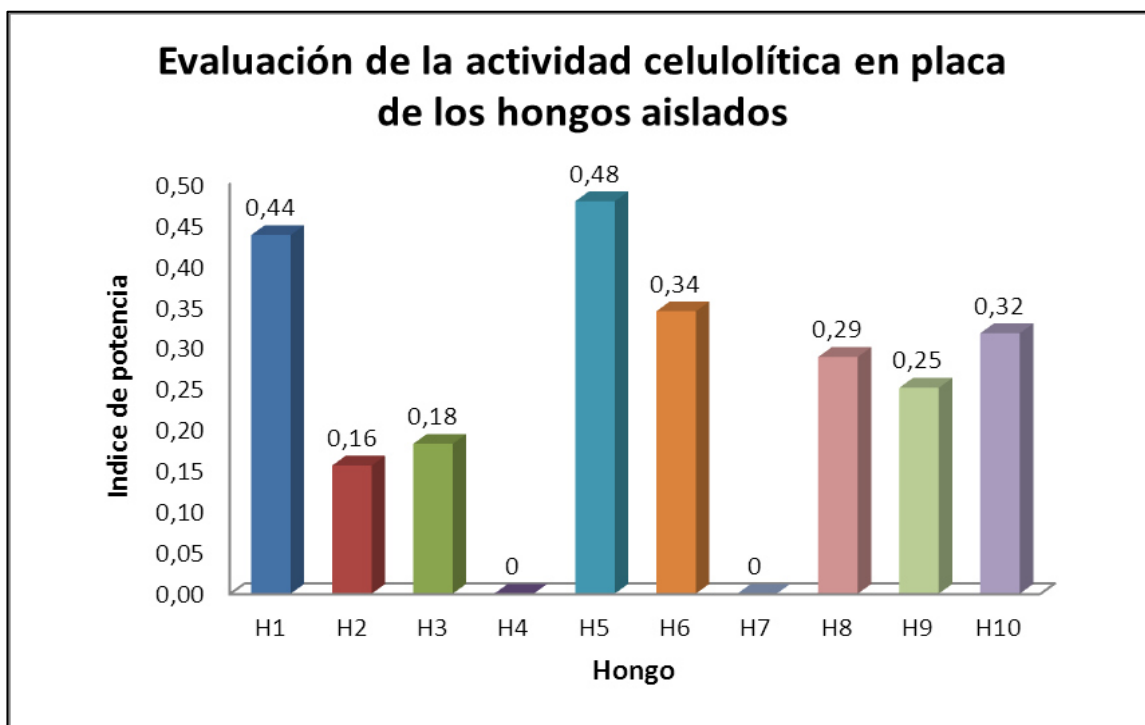


Figura 6. Gráfico comparativo de los distintos índices de potencia de los hongos aislados.  
El hongo 4 y 7 no dieron resultado positivo.

### 4.3 Identificación del microorganismo

#### 4.3.1 Determinación del género

Entre las características macroscópicas que presenta el hongo seleccionado (H5), se encuentra la formación de colonias color verde oliva a verde oscuro con pigmentación uniforme, de apariencia ligeramente rugosa y aterciopelada. Entre sus características microscópicas se puede apreciar la formación de hifas septadas, conidióforos erguidos, pigmentados, ramificados, simpodial, conidias cilíndricas a elípticas (Figura 7).

Realizando una extensiva búsqueda bibliográfica y comparando con perfiles morfológicos reportados para otros hongos filamentosos, se determinó que por sus condiciones de crecimiento, características macroscópicas y microscópicas, además de su hábitat natural, el microorganismo en estudio pertenece al género *Cladosporium*.

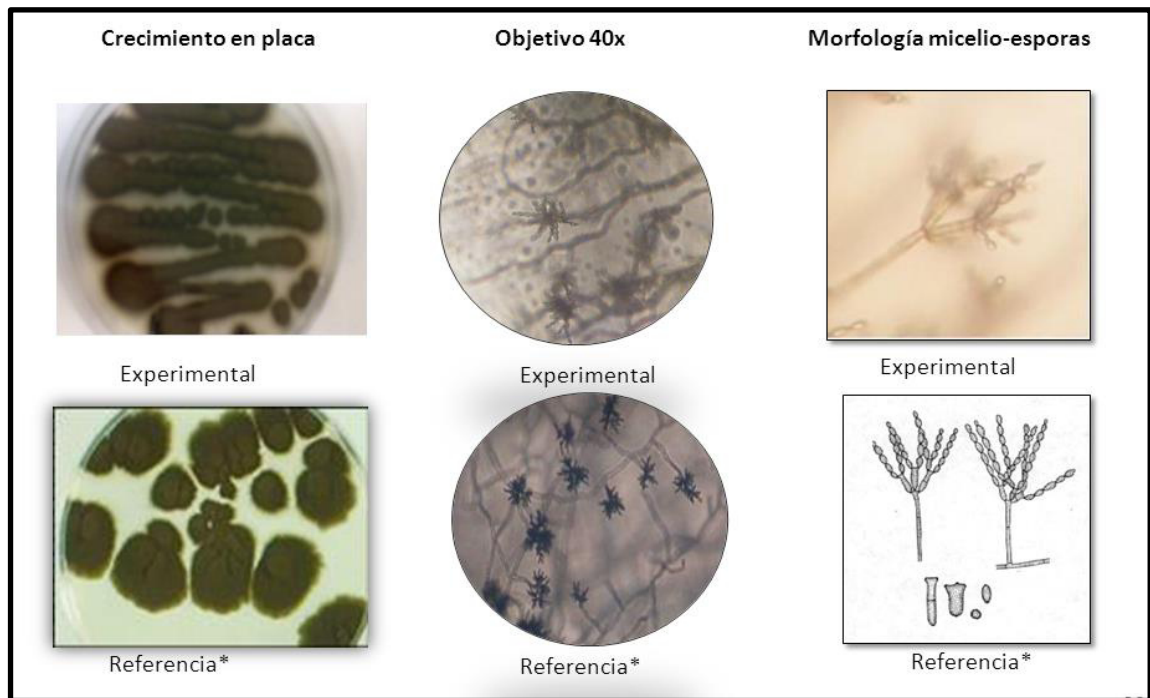


Figura 7. Análisis comparativo de las características macroscópicas y microscópicas del microorganismo aislado.

(\*Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungal Database, United States Agriculture Department).

#### 4.3.2 Determinación de la especie

Mediante el análisis de PCR se logró amplificar el fragmento 5.8S del RNA de alrededor de 550pb (Figura 8). Se reporta que el fragmento amplificado tiene un tamaño en pares de bases que oscila entre los 450 a 600, dependiendo de la especie del hongo.

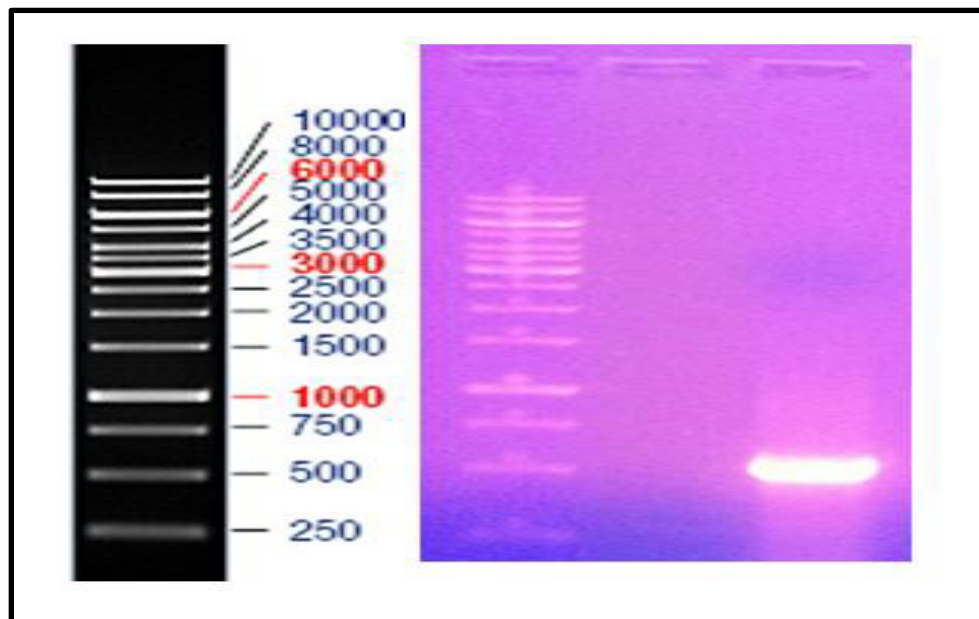


Figura 8. Electroforesis del fragmento amplificado por PCR del 5.8S RNA del hongo aislado

La secuencia obtenida de la amplificación de la región del ITS 5.8S RNA se reporta en el apéndice 5. Dicha secuencia se analizó comparativamente utilizando la base de datos del NCBI. El análisis del alineamiento de la secuencia utilizando la plataforma BLAST® mostró una homología del 100% para el género *Cladosporium*. En la tabla V se enlistan las especies de *Cladosporium* que presentaron mayor homología.

Microorganismo	% de Homología	Número de Accesoión
<i>Cladosporium inversicolor</i>	97	HM148107.1
<i>Cladosporium cucumericum</i>	97	HM148068.1
<i>Cladosporium oxysporium</i>	97	KC959209.1
<i>Cladosporium silennes</i>	97	JQ754032.1
<i>Cladosporium delicatulum</i>	97	HM148087.1
<i>Cladosporium gossypicola</i>	98	AF393702.2
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	98	HM776419.1
<i>Cladosporium funiculosum</i>	98	HM148094.1
<i>Cladosporium herbarum</i>	99	HM595523.1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99	AY251070.2

Tabla V. Resultado del análisis filogenético del hongo aislado y su proximidad con otras especies

Realizando una comparación de las características de las colonias se determinó que el microorganismo pertenece al género *Cladosporium* y a la especie *cladosporioides*.

#### 4.4 Fermentación en sustrato sólido

El hongo aislado y los de referencia mostraron crecimiento a diferentes tiempos y en diferente proporción, además de haber presentado diferentes requerimientos de humedad; sin embargo, el residuo en el que se observó mayor producción enzimática para los tres hongos, en general, fue el de maíz, seguido del trigo y, finalmente el arroz, en el cual el *Trametes trogii* no mostró crecimiento.

*Cladosporium cladosporioides* creció sobre los diferentes sustratos al cabo de las 48 horas; sin embargo, la actividad celulolítica no se observó de forma significativa hasta las 72 horas en la cascarilla de trigo, hasta las 168 horas (7 días) en el pericarpio de maíz y hasta las 192 horas (8 días) en el arroz. La máxima actividad celulolítica se observó a las 288 horas (12 días) en los tres sustratos, obteniendo la mayor actividad en el maíz, seguida del trigo y, finalmente, el arroz. (Figura 9).

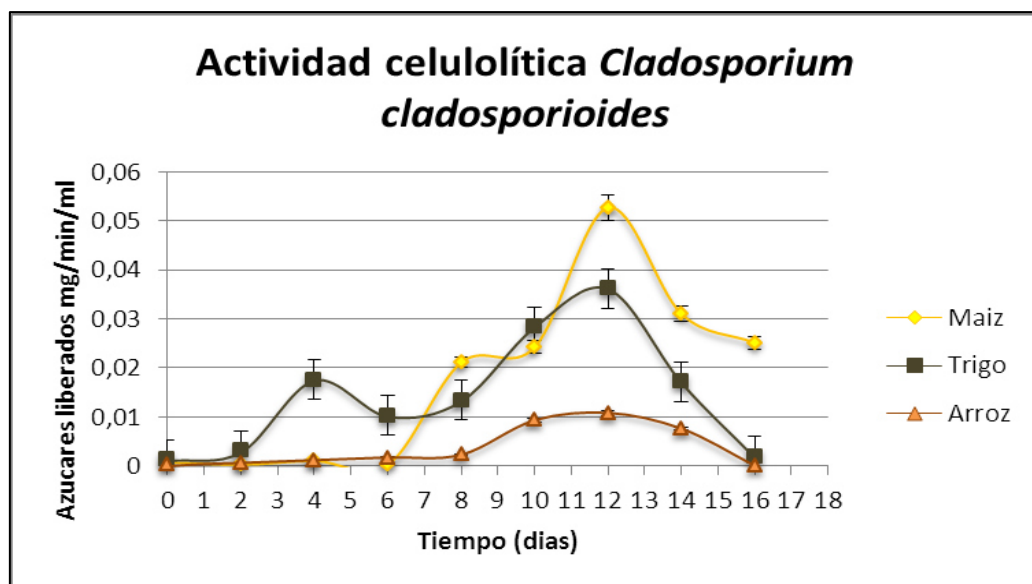


Figura 9. Actividad celulolítica del hongo *Cladosporium cladosporioides* sobre los diferentes sustratos lignocelulósicos durante el período de fermentación.

En el caso de *Aspergillus niger*, la aparición de actividad celulolítica se presentó en los primeros días de la fermentación, dando su valor máximo en el sustrato del maíz a los 4 días, y en trigo y arroz a los 6 días de iniciada la fermentación (Figura 10), en contraste con lo observado *Cladosporium cladosporioides* cuyo tiempo máximo fue a los 12 días. Sin embargo, después de unos pocos días de incubación se observó una disminución marcada de la actividad celulolítica siendo la mínima para los tres sustratos a los 10 días, seguido de una tendencia ascendente que volvía a disminuir al cabo del tiempo de los 16 días (Figura 10).

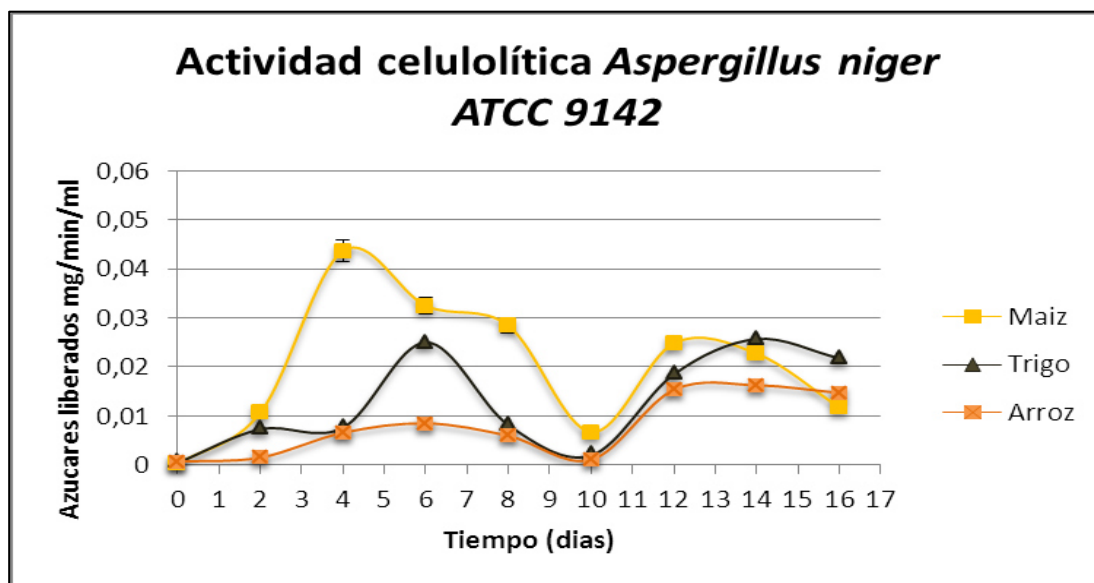


Figura 10. Actividad celulolítica del hongo *Aspergillus niger* sobre los diferentes sustratos lignocelulósicos durante el período de fermentación.

Respecto al *Trametes trogii* se observó un comportamiento muy diferente en la producción de la actividad celulolítica. El tiempo en el que se observó la mayor actividad celulolítica fue a los dos días en el maíz y 10 días para el residuo de trigo. Para el residuo de arroz no presentó crecimiento favorable (Figura 11).

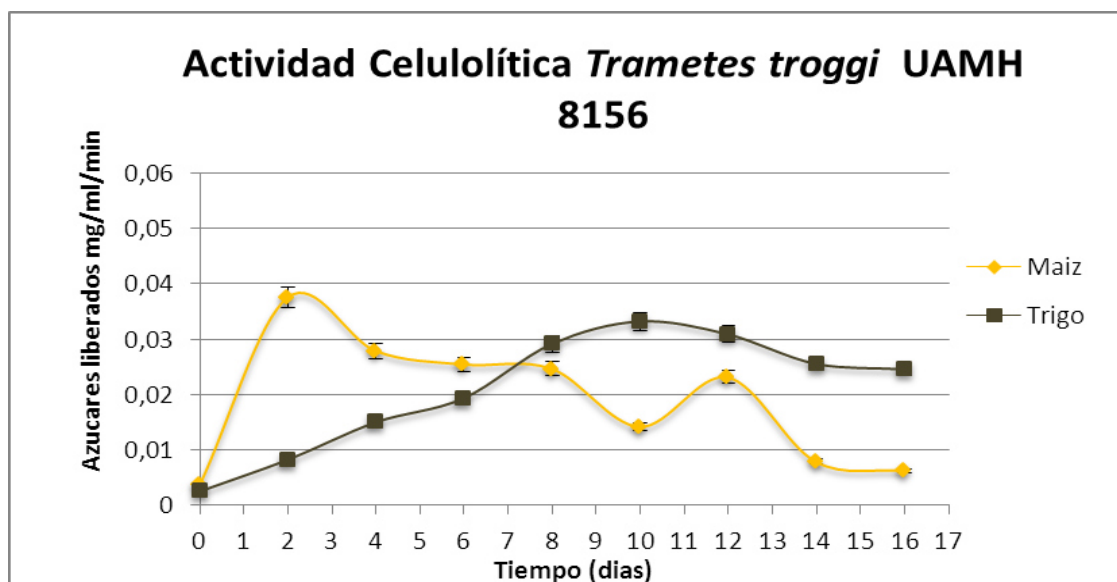


Figura 11. Actividad celulolítica del hongo *Trametes trogii* sobre los diferentes sustratos lignocelulósicos durante el período de fermentación.

#### 4.4.1 Monitoreo de la producción de enzimas celulolíticas en función del crecimiento del microorganismo

A partir de los 4 días de fermentación se observó un incremento marcado en la cantidad de biomasa (Figura 12); sin embargo, se observa que previo al aumento de la biomasa hay actividad celulolítica, que posteriormente se va incrementando casi a la par del crecimiento del microorganismo para llegar a un punto máximo alrededor del día 12, manteniéndose por un par de días más y, finalmente, adquirir una tendencia a disminuir.

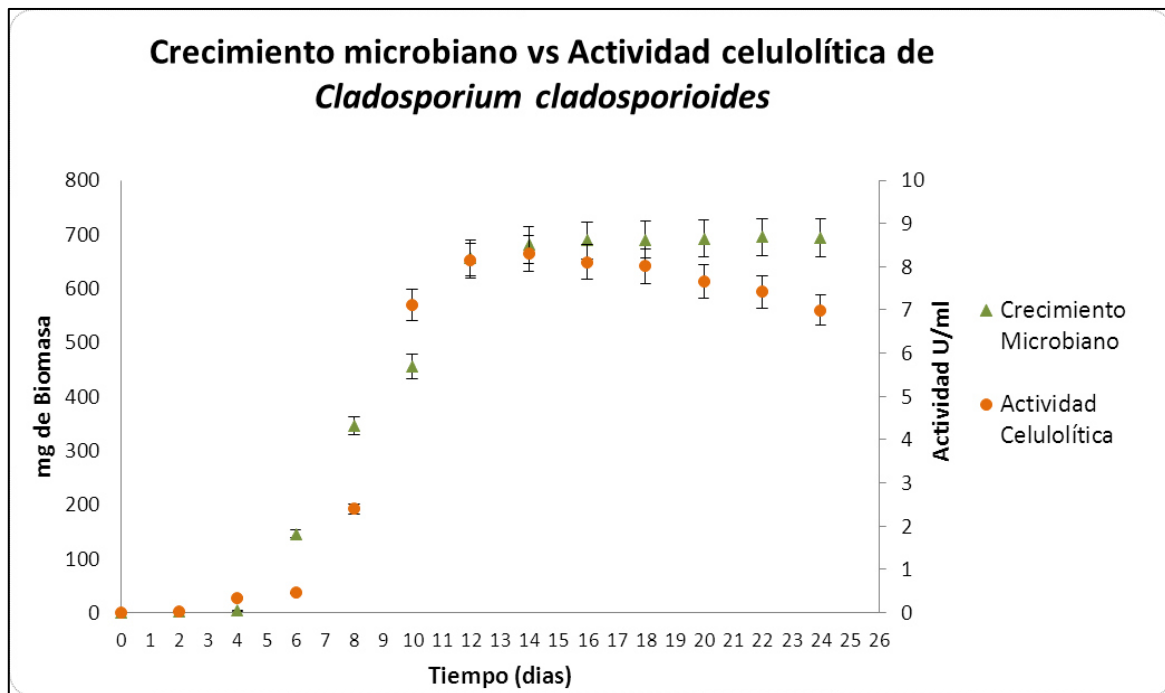


Figura 12. Actividad celulolítica en función del crecimiento microbiano.

#### 4.5 Purificación de proteínas

Una vez finalizada la fermentación en sólido, se procedió a extraer y concentrar las enzimas mediante los métodos ya descritos, recuperándose un volumen final de 5 ml. Posteriormente, se realizó una separación electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes para conocer el intervalo de peso molecular en el que se encuentran las proteínas presentes en el extracto. Se observó que tanto al 6.5% como al 12% de concentración de poliacrilamida, no se mostraba ninguna banda presente por encima de los 120 KDa (Figura 13).



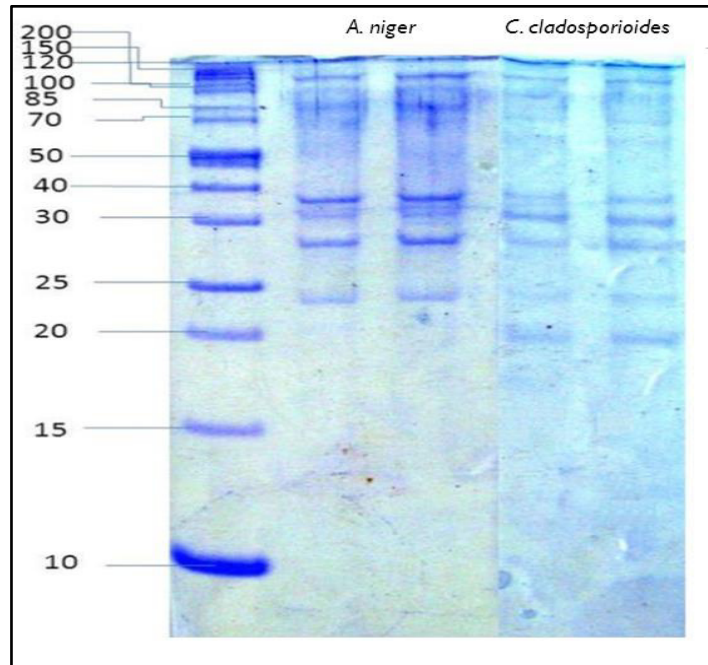


Figura 13. SDS-PAGE al 12% de extractos de *Aspergillus niger* y *Cladosporium cladosporioides*.

Una vez conocido el peso molecular de las diferentes fracciones proteicas a analizar, se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño, en la cual se fue monitoreando la cantidad de proteínas que eluían de la columna mediante el método de Bradford. En la figura 14 se puede observar que las fracciones proteicas se separan satisfactoriamente hasta la fracción número 45 donde ya no se detectó presencia de proteínas. Durante la colección de las diferentes fracciones se fue analizando simultáneamente la actividad de cada enzima para identificar en que fracción se estaban separando, encontrándose que las fracciones 4 a la 8 presentaron actividad para la Exoglucanasa, de la fracción 9 a la 12 actividad  $\beta$ -Glucosidasa y para la actividad endoglucanasa se distinguieron 2 zonas: la primera en las fracciones 13 a la 16 y la segunda en las fracciones 17 y 18 (figura 14).

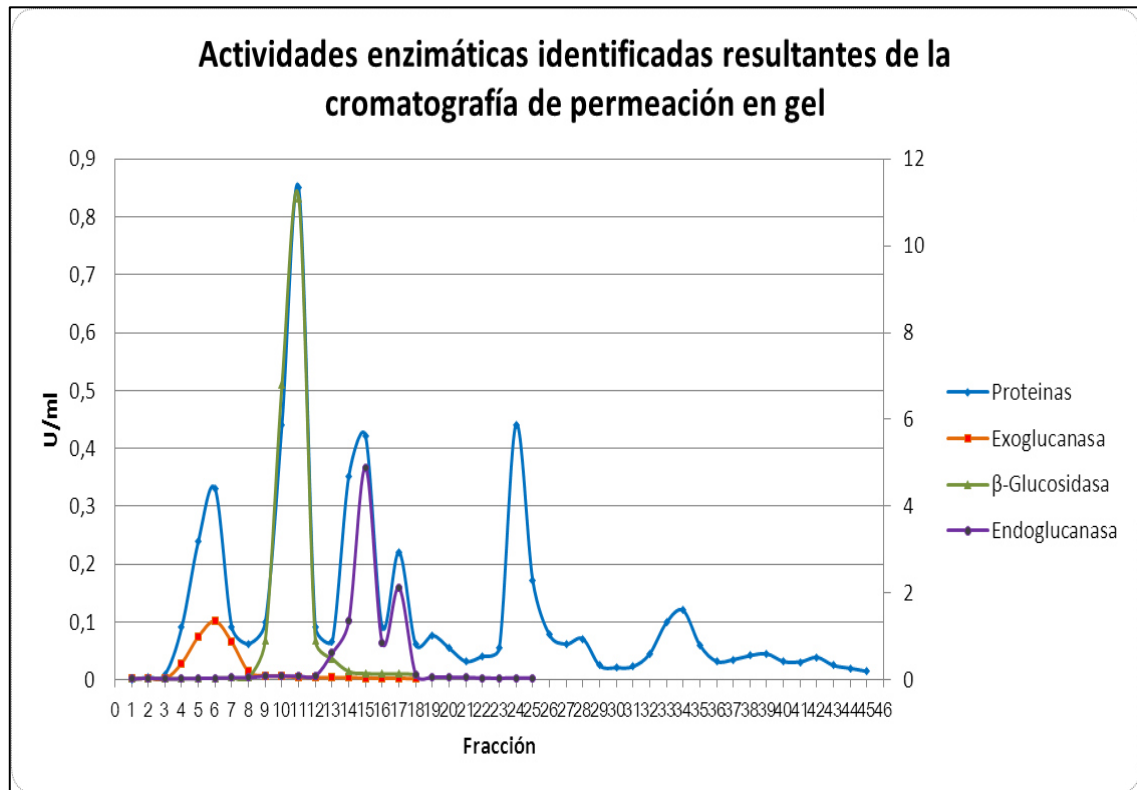


Figura 14. Elución de las proteínas sobre la columna de permeación en gel. La migración ocurre primero por parte de la exoglucanasa, seguido de la  $\beta$ -Glucosidasa y finalmente la endoglucanasa que mostró 2 zonas.

Para determinar el índice de purificación, se analizó la cantidad de proteína y actividad presente en cada fase de purificación. En condiciones ideales se espera que la cantidad de proteína total vaya disminuyendo conforme se van realizando las distintas etapas de purificación, al tiempo que la actividad enzimática se mantiene o aumenta en proporción a la cantidad de proteína que se tenía originalmente del extracto. Este se cumplió parcialmente, debido a que la Endoglucanasa (Tabla VI) y Exoglucanasa (Tabla VII) mantuvieron la actividad significativamente; sin embargo, la actividad de la  $\beta$ -Glucosidasa (Tabla VIII) disminuyó considerablemente en la última fase de purificación.

<b>ENDOGLUCANASA</b>				
<b>Fase de purificación</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Actividad Total (UI)</b>	<b>Actividad específica (UI/mg)</b>	<b>Purificación</b>
Extracto Crudo	25,8	35,12	1,36	1
Precipitación (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22,35	34,48	1,54	1,13
Diálisis / Ultrafiltración	12,75	31,1	2,49	1,83
Biogel P-100	0,44	4,89	11,11	8,16

Tabla VI. Purificación de la Endoglucanasa

<b>EXOGLUCANASA</b>				
<b>Fase de purificación</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Actividad Total (UI)</b>	<b>Actividad específica (UI/mg)</b>	<b>Purificación</b>
Extracto Crudo	25,8	11,12	0,43	1
Precipitación (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22,35	10,38	0,464	1,06
Diálisis / Ultrafiltración	12,75	9,91	0,775	1,8
Biogel P-100	0,33	1,35	4,09	9,51

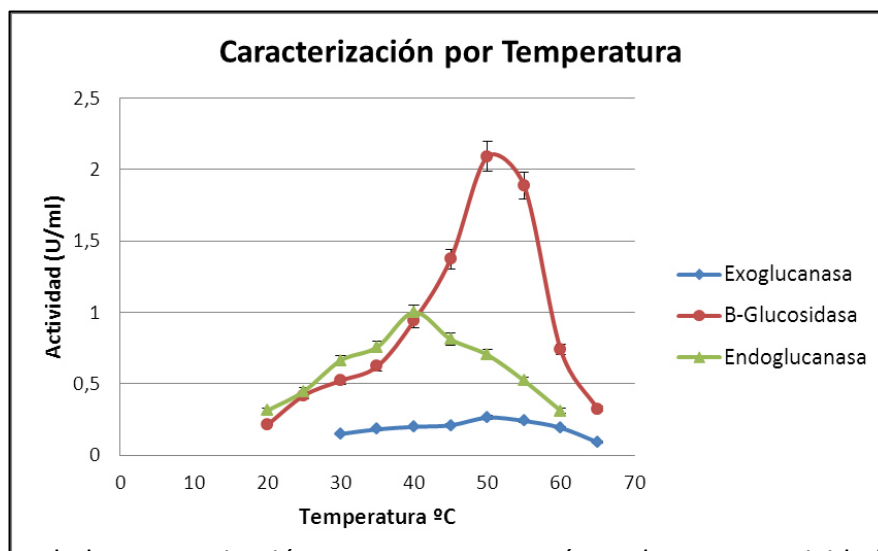
Tabla VII. Purificación de la Exoglucanasa

<b>β-GLUCOSIDASA</b>				
<b>Fase de Purificación</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Actividad Total (UI)</b>	<b>Actividad específica (UI/mg)</b>	<b>Purificación</b>
Extracto Crudo	25,8	201,12	7,79	1
Precipitación (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22,35	198,2	8,86	1,13
Diálisis / Ultrafiltración	12,75	133,1	10,43	1,33
Biogel P-100	0,85	11,18	13,05	1,67

Tabla VIII. Purificación de la β-Glucosidasa

#### 4.6 Caracterización de las enzimas

Para la caracterización enzimática por temperatura, se encontró que la temperatura óptima para la endoglucanasa fue a 45°C y para la exoglucanasa y  $\beta$ -Glucosidasa fue a 50°C (Figura 15).



En el caso de la caracterización por pH se encontró que la mayor actividad catalítica se encuentra a pH de 4.5 para la endoglucanasa, y a pH de 5 para la exoglucanasa y la  $\beta$ -Glucosidasa (Figura 16).

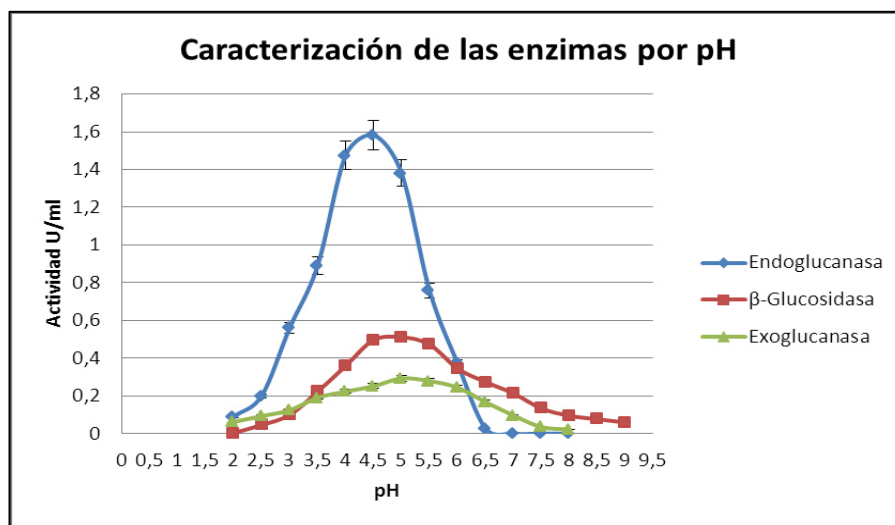


Figura 16. Caracterización de las enzimas por pH

El zimograma realizado para la enzima endoglucanasa dio por resultado la aparición de 2 bandas de hidrólisis en el gel en un intervalo de 15 a 30 KDa (Figura 17). Se procedió a calcular el peso molecular y se determinó que las enzimas con actividad endoglucanasa tienen un peso de 23.4 y 26.3 KDa, respectivamente.

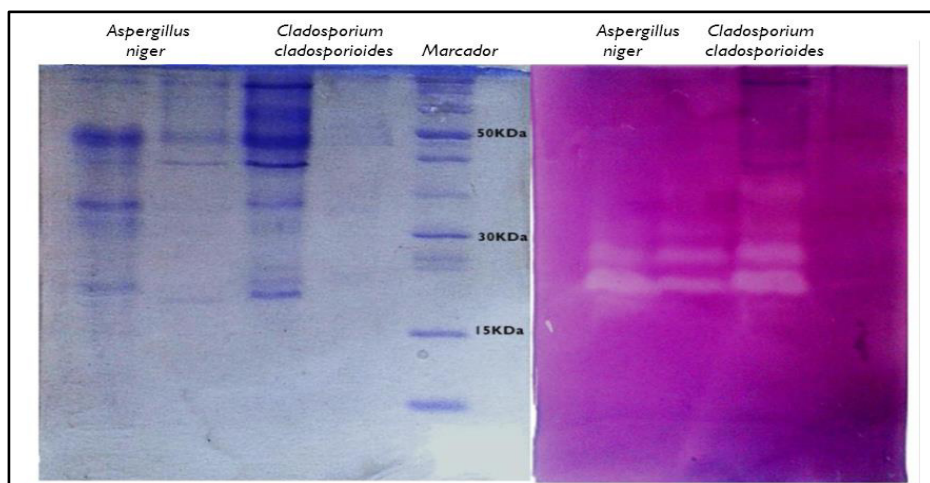


Figura 17. Zimograma electroforético de las fracciones concentradas de *Aspergillus niger* y *Cladosporium cladosporioides* resultantes de la fermentación

En el zimograma realizado para determinar el peso molecular de la exoglucanasa se observó la aparición de una banda en la parte superior del gel que emitía luminiscencia al exponer el gel a la luz UV, (Figura 18). Después de realizar los cálculos se determinó que la enzima ubicada en esta banda tenía un peso de 98.37KDa.

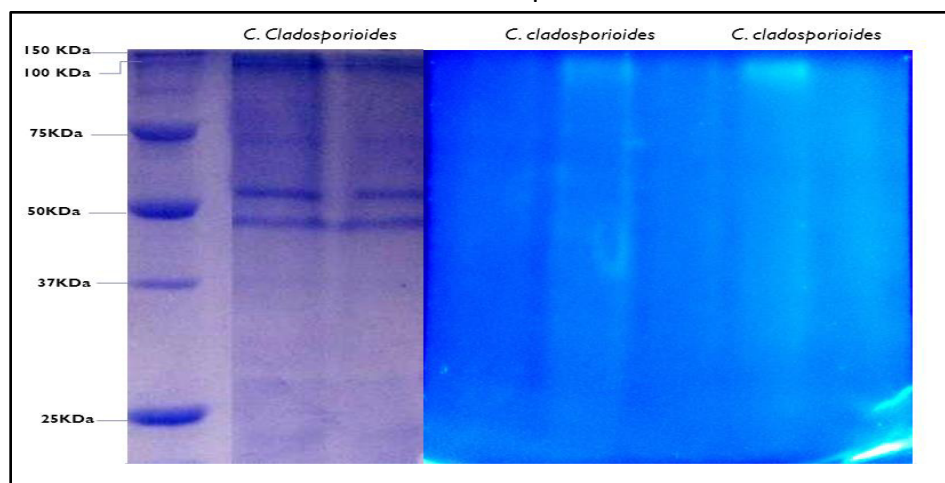


Figura 18. Zimograma de las fracciones de los concentrados enzimáticos de *Cladosporium cladosporioides*. La banda luminiscente evidencia la actividad de la exoglucanasa.

Para la determinación del peso molecular de la  $\beta$ -Glucosidasa, en el zimograma apareció una banda que presentó luminiscencia apenas por encima de los 75KDa. Después de realizar los cálculos correspondientes se determinó que su peso era de 77.44 KDa.

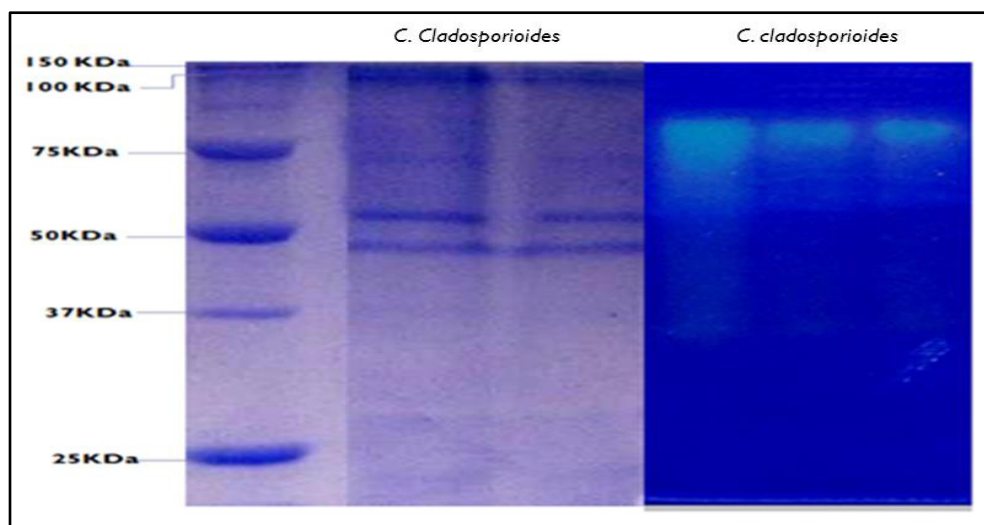


Figura 19. Zimograma de la  $\beta$ -Glucosidasa. Las bandas emiten luminiscencia después de la remoción del SDS e incubación a 50°C por 15 minutos.

#### 4.7 Discusión de resultados

En la naturaleza coexisten, una gran cantidad de microorganismos coexisten en consorcios microbianos que en conjunto son capaces de degradar una gran cantidad de sustratos, entre ellos la biomasa vegetal; sin embargo, no todos ellos tienen la misma capacidad metabólica para producir las enzimas necesarias para degradar sustratos tan complejos como la celulosa, como se aprecia en los análisis anteriores, la mayoría de los hongos aislados exhibió actividad celulolítica en placa, mostrando algunos mayor crecimiento que otros. Los microorganismos que no lograron degradar el sustrato celulósico tampoco mostraron un crecimiento abundante, debido a que no les fue posible aprovechar la fuente de carbono del medio de cultivo.

El hongo seleccionado y caracterizado posteriormente como *Cladosporium cladosporioides* se clasifica taxonómicamente en la siguiente tabla:

Clasificación taxonómica del hongo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	
<b>Dominio</b>	Eukarya
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Filo</b>	Ascomycota
<b>Clase</b>	Dothideomycetes
<b>Orden</b>	Capnodiales
<b>Familia</b>	Davillaceae
<b>Genero</b>	Cladosporium
<b>Especie</b>	cladosporioides

Tabla IX Clasificación de *C. cladosporioides*

Es reportado como una especie fitopatógena y saprófita, que se puede encontrar sobre vegetación o en el suelo (Brensch K. et al., 2012). Es un género de distribución cosmopolita, siendo uno de los taxones más aislado y abundante en los recuentos aerobiológicos de todo el mundo (Jacyno JM, et al. 1993). Al realizar la caracterización molecular se encontró una gran similitud genética con la especie *Cladosporium herbarum* y, aunque esta especie se suele encontrar en condiciones ecológicas muy similares a las de *Cladosporium cladosporioides* y también es una especie fitopatógena (Samson, RA, et al. 2004), las características del cultivo y la morfología permitieron distinguir con facilidad entre una especie y otra (Brensch K. et al. 2012)

En la producción de enzimas celulolíticas utilizando diferentes microorganismos y sustratos provenientes de la industria agrícola, se pudo observar una marcada tendencia en la producción de enzimas en el sustrato del maíz. Varios factores se pueden considerar, el más importante de ellos es la cantidad de celulosa que contiene

el sustrato, debido a que es el principal inductor de la actividad celulolítica y que posiblemente los sustratos de trigo y arroz tuviesen la celulosa en menor proporción o bien, no se encontraba físicamente tan disponible como en el maíz. El pretratamiento para la remoción del almidón en el pericarpio del maíz llevado a cabo para los experimentos de esta investigación, involucra altas presiones y temperaturas lo cual también pudo haber causado pérdida de estabilidad en la celulosa para favorecer el ataque microbiano.

Otro factor que pudo haber favorecido la producción de enzimas celulolíticas en el sustrato de maíz, es el proceso del cual proviene dicho residuo (nixtamalización), el cual consiste en someter a altas temperaturas, presiones y agentes químicos al maíz, pudiendo así hidrolizar parcialmente la biomasa vegetal, disminuyendo aún más la estabilidad de la celulosa y dejándola más disponible para el ataque microbiano (Martinez R. et al. 2001).

En la comparación entre la producción de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger*, *Trametes troggi* y *Cladosporium cladosporioides* se observó una marcada diferencia en el tiempo de producción y la proporción de enzimas producidas. *Trametes troggi* fue el hongo que produjo enzimas celulolíticas más rápidamente (a los 2 días); sin embargo, fue el que menos produjo de los tres hongos evaluados, además de no presentar actividad sobre el residuo de trigo. *Aspergillus niger* produjo una gran cantidad de enzimas celulolíticas en un periodo de cuatro días, mostrando también una buena actividad sobre el residuo de trigo y un poco menos en el residuo de arroz, la actividad celulolítica se iba presentando en función al crecimiento de cada hongo, por



lo que se presume, hay una estrecha relación entre la cantidad de biomasa producida y la producción de enzimas celulolíticas. *Cladosporium cladosporioides* produjo enzimas celulolíticas a un tiempo más prolongado (12 días); sin embargo, obtuvo mayor actividad enzimática que los microorganismos utilizados como referencia.

Respecto a la relación de la actividad celulolítica en función al crecimiento del hongo sobre el pericarpio del maíz, se observó que el crecimiento de la biomasa se vio aumentado significativamente hasta los 4 días de incubación. Usualmente, en un cultivo enriquecido, el crecimiento de la biomasa no excede de los tres días (Gibbs P.A. et al. 2000); sin embargo, se asume que por ser un sustrato de difícil hidrólisis puede retrasar el crecimiento del microorganismo (Dashtban M. et al. 2009). No obstante, se observó aparición de actividad celulolítica previa a la fase de crecimiento exponencial, lo cual apoya las teorías que existen celulasas de forma constitutiva en las conidias de las esporas en germinación que comienzan a degradar el sustrato vegetal (Manabu S y Fusao T., 2001), para favorecer el crecimiento del microorganismo. De forma convencional, en los medios de cultivo se adicionan agentes que favorecen el crecimiento microbiano, y una vez agotado este componente, el microorganismo se ve forzado a producir nuevas enzimas para aprovechar fuentes de carbono adicionales y mantener un equilibrio una vez que ha alcanzado la fase estacionaria. La capacidad de algunos hongos, como en *Cladosporium cladosporioides*, de contener celulasas constitutivas, es una característica que favorece la producción a gran escala, debido a que se reducirían considerablemente los costos.

En lo que respecta a la purificación de las enzimas se pudo observar en las electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, que no se observaron proteínas en un intervalo fuera de 20 a 120 KDa. Este resultado es concordante por varias razones: el tamaño de las enzimas extracelulares de la mayoría de los hongos con actividad celulolítica no exceden de los 200KDa (Henrissat B. y Romeu A., 1995); las enzimas de mayor tamaño suponen grandes complejos proteicos asociados a subunidades más grandes que se encuentran dentro de la célula.

Las enzimas de bajo peso molecular y otras proteínas de carácter residual, fueron removidas del concentrado enzimático mediante las diferentes fases de purificación, particularmente en la fase de ultrafiltración, en la que se descartaron aquellas proteínas de tamaño menor a 10KDa, y otros componentes, como azúcares simples, oligosacáridos, sales minerales, entre otros. No obstante, la fase de purificación que mostró mejores resultados fue la cromatografía de permeación en gel, la cual permitió separar de manera selectiva cada fracción proteica con una mayor resolución, favoreciendo la recuperación de una mayor cantidad de enzimas para realizar análisis posteriores. La diferencia de pesos moleculares de cada enzima fue el factor que permitió la separación de las distintas enzimas por cromatografía de exclusión por tamaño, sin embargo, las enzimas no se lograron purificar completamente, por lo que se podrían implementar otros métodos de purificación como cromatografía de afinidad o de intercambio iónico (Bin T. et al. 2012). Sin embargo, para los objetivos del presente trabajo el grado de purificación alcanzado fue satisfactorio.

Analizando los patrones electroforéticos obtenidos y la aparición de las diferentes enzimas en las distintas fracciones colectadas de la cromatografía de permeación en gel se observó en este estudio que la primera enzima en eluir fue la exoglucanasa, seguida de la  $\beta$ -glucosidasa, y finalmente, la endoglucanasa. Examinando los pesos moleculares, se determinó que los resultados concuerdan con lo esperado ya que mediante la técnica utilizada las moléculas de mayor tamaño migran más rápidamente por la matriz de la columna, y las de menor peso molecular son retenidas mayor tiempo, por lo que era de esperarse que la enzima de mayor tamaño saliera primero (Bin T. et al. 2012). La caracterización enzimática mediante actividad específica, peso molecular, temperatura y pH óptimos para la actividad catalítica permiten realizar una comparación con los reportes bibliográficos (Henrissa B. y Bairoch A., 1995) para cada enzima producida.

En el caso de la endoglucanasa y la  $\beta$ -glucosidasa, pudo comprobarse que las características de actividad enzimática, tamaño y temperatura coinciden o bien, se aproximan estrechamente a los valores reportados para enzimas celulolíticas de origen fúngico, particularmente del hongo *Trichoderma reesei* (Ramos R. y Gutierrez-Correa M. 1994 ). Sin embargo, la Exoglucanasa que se identificó en este trabajo no coincidió con ninguna de las reportadas para *Trichoderma reesei* pero sus características coinciden estrechamente con una Exoglucanasa reportada para la bacteria *Clostridium thermoacellum* (Zverlov V.V. et al. 2001). Debido a que la enzima fúngica se asemejaba a la de una bacteria, se realizó una revisión bibliográfica más a fondo y se encontró que otros organismos también son capaces de producir dicha enzima, como es el caso de *Coniothyrium minitans* (Gabor G. et al., 2001). (Tabla IX).

Enzima	Masa (Kda)	pH óptimo	Referencia
Endoglucanasas			
<b>Cel7b</b>	48.208	5.0-5.3	Eriksson T. et al. 2002
<b>Cel5a</b>	44.227	4.8-5.0	Park IH et al. 2012
<b>Cel61a</b>	35.11	4-8-5.0	Karlsson J. et al. 2001
<b>Cel12A</b>	25.159	5.0-5.5	Henriksson G. et al. 1999
<b>Enxoglucanasa en estudio*</b>	26.3	4.5	NA
Exoglucanasas			
<b>Cel7a</b>	54.073	4.5-4.9	Eriksson T. et al. 2002
<b>Cbh2</b>	49.65	4.3-5.0	Covert S. et al. 1993
<b>Cel K (Clostridium thermocellum)</b>	100.62	5-5.5	Kruus K. et al. 1995
<b>Exoglucanasa en estudio*</b>	98.37	5	NA
$\beta$ -Glucosidasas			
<b>Cel3a</b>	78.433	4.8-5.5	Perez J. et al. 1994
<b>Cel1a</b>	54.24	4.5-5.0	Mantyla A. et al. 1998
<b><math>\beta</math>-Glucosidasa en estudio*</b>	77.44	5	NA

Tabla X. Comparación de las enzimas producidas con los reportes bibliográficos

En la evaluación de las diferentes actividades enzimáticas encontradas en la fermentación en sólido utilizando pericarpio de maíz con el hongo *Cladosporium cladosporioides*, se obtuvieron actividades enzimáticas para Endoglucanasa de 11.1U/mg de proteína, para Exoglucanasa de 4.09U/mg de proteína y para  $\beta$ -Glucosidasa 13.05 U/mg de proteína. Estos valores son comparables con los reportados por otros autores que utilizaron otros microorganismos, entre los que figuran bacterias y levaduras (Tabla X). También han utilizado sustratos muy variados que van desde celulosas de alta cristalinidad hasta residuos de papel.

Sustrato	Microorganismo	Método	Enzimas: Actividades	Referencia
Celulosa Microcristalina (Avicel)	<i>Aspergillus niger</i> A-10	SmF	Celobiasa 27.5 U/ml	Dutta T. , Sahoo R. 2008
Celulosa en Polvo(Solka-Folk)	<i>Acremonium Cellulolytius</i>	SmF	Endoglucanasa: 1.89U/ml	Xu F. ,Yano S. 2009
Lactosa	<i>Mucor circilllenoides</i>	SmF	Exoglucanasa: 0,25 U/ml	Saha B.C., 2004
Carboximetil Celulosa	<i>Rodothermus marinus</i>	SmF	Endoglucanasa: 97.7 U/ml	Hreggvidsson, Kaiste E. 1996
Xilosa	<i>Thermothoga maritima</i>	SmF	Endoglucanasa:11mU/ml Avicellasa: 0,3mU/ml $\beta$ -glucosidasa 30mU/ml	Bronnenmeier K, Kern A, 1995
Rastrojo de Maíz	<i>Trichoderma reseei</i>	SSF	Celulasa: 5.48 U/ml Fpasa: 0.25U/ml	Xen L.,Xia 2004
Salvado de Trigo	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	SmF	CMCase: 0.50 U/ml	Grigorevski de-Lima AL, do-Nascimento RP, 2005
Bagazo de Caña Azucarera	<i>Penicillium jantienellum</i>	SmF	Fpasa: 0.55 U/ml CMCasa:25.1 U/ml $\beta$ -glucosidasa 2.3U/ml	Adsul MG, Ghule JE,2004
Residuos de la industria de soya	<i>Bacillus subtilis</i>	SSF	Fpasa: 1.8U/mg proteína	Heck JX, Hertz PF 2002
Residuos de banano	<i>Bacillus subtilis</i>	SSF	Fpasa: 2,8U/gds CMCasa:9.61 U/gds* Celobiasa: 4.1U/gds	Krishna C. 1999
Pulpa de papel	<i>Penicillium occitanis</i>	SmF – feed batch	CMCasa : 21U/ml Fpasa: 23U/ml	Belghith H, Ellouz-Chaabouni S, 2001

Tabla XI. Comparación de las enzimas celulolíticas producidas por diferentes organismos y sustratos  
\*gds: gramo de sustrato

Los resultados obtenidos también son comparables con los de algunos preparados enzimáticos que actualmente se encuentran en el mercado, entre los que se pueden mencionar Celluclast<sup>®</sup> de Novozymes Inc. con actividad exoglucanasa de 0.4U/mg de proteína, Acellerace BG<sup>®</sup> de Genecor Inc. con actividad  $\beta$ -Glucosidasa 3U/mg de proteína y Econase CE de Enzyme Development Corporation, con actividad Endoglucanasa de 15 U/mg de proteína.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 Conclusiones

- Se logró caracterizar morfológica y molecularmente el hongo aislado, concluyendo que pertenece al género *Cladosporium* y a la especie *cladosporioides*.
- *Cladosporium cladosporioides* produce diversos tipos de enzimas capaces de degradar material lignocelulósico, y las produce además en una cantidad elevada.
- Se produjeron, identificaron, caracterizaron y purificaron parcialmente las enzimas Endoglucanasas, Exoglucanasas y  $\beta$ - Glucosidasas a partir de *Cladosporium cladosporioides*
- Las enzimas producidas por *Cladosporium cladosporioides* presentan actividades enzimáticas comparables e incluso superiores a las de los hongos utilizados como referencia, así como a las de otros microorganismos en otros procesos y algunas enzimas comerciales.
- De los residuos lignocelulósicos evaluados, el que induce mejor a la producción de enzimas celulolíticas es el pericarpio de maíz.

## **5.2 Enfoque verde del proyecto**

El presente proyecto tuvo además como finalidad durante su desarrollo, el disminuir la cantidad de emisiones generadas evitando en la manera de lo posible, el uso de agentes químicos que puedan ser potencialmente dañinos para la salud y el medio ambiente.

El microorganismo utilizado al ser aislado de materia vegetal de un ecosistema local presenta una gran capacidad de producción de diferentes tipos de enzimas, además de enzimas celulolíticas que pueden ser aprovechadas para otros procesos biotecnológicos. Los residuos producidos a partir de la fermentación en sólido se han destinado a la búsqueda de materiales alternativos para la biosorción de colorantes.

## CAPÍTULO 6

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aubert JP (1994) Recognition specificity of the duplicated segments present in *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelD and in the cellulosome-integrating protein CipA. *J Bacteriol* 176:2822–2827
2. Abdel-Fattah AF, Osman MY, Abdel-Naby MA.(1997) Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20. *Chem Eng J*; 68:189–96.
3. Adsul MG, Ghule JE, Singh R, Shaikh H, Bastawde KB, Gokhale DV, Varma AJ.(2004). Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydr Polym*; 57:67–72.
4. Ali A. Juwaied, Ahmed Abdulamier Hussain Al-amiery, Zahraa Abdumunim and Umar Anaam. (2011). Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using sugar cane waste *Journal of Yeast and Fungal Research* Vol. 2(2), pp. 19
5. Anderson, W. Dien, B., Brandon, S. & Peterson, J. (2008). Assessment of bermudagrass and bunch grasses as feedstock for conversion to ethanol. *Appl Biochem, biotechnol* 145, 13-21
6. Bauer, W.D.(1973).The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 51: 174-187.
7. Baker JO, McCarley JR, Lovett R, Yu CH, Adney WS, Rignall TR.(2005). Catalytically enhanced endocellulase Cel5A from *Acidothermus cellulolyticus*. *Appl Biochem. Biotechnol* ;121–124:129–48
8. Belghith H, Ellouz- Chaabouni S & Gargouri A.(2001). Biostonig of denims by *Penicillium occitanis* vol 6: Cellulases. *J biotechnol*, 89 257-262



9. Bensch K. Braun U., Gronenwald J.Z. and P.W. Crous (2012) The Genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72: 1–401.
10. Bidlack, J., Malone, M. & Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *ProcOklaAcad Sci.* 71, 51-56.
11. Bhat MK & Bhat S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *Biotechnol Adv.*, 15 583-520
12. Blotkamp, P.J., Takagi, M., Pemberton, M.S.(1978). Enzymatic hydrolysis of cellulose and simultaneous fermentation to alcohol. Biochemical engineering: renewable sources of energy and chemical feedstocks. *AIChE Symp. Series* 74 (181), 85–90
13. Bradford, M.(1976). A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* 72, 248– 254.
14. Bronnenmeier K, Kern A, Liebl W, Staudenbauer WL. (1995) Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1399–407.
15. . Brummell David A, Harpster Mark H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Cell Walls* , pp 311-340.
16. Brumm Philip J. (2013) Bacterial genomes: what they teach us about cellulose degradation. *Biofuels*, Vol. 4, No. 6, Pages 669-681
17. Cinar I. (2005). Effects of cellulose and pectinase concentrations on the colour of yield of enzyme extracted plant carotenoids. *Process Biochem*, 40 945-949.
18. Covert S., Vaden A., Cullen D.(1993). Identification of the gene encoding the major cellobiohydrolase of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* October; 59(10): 3492–3494.
19. Chahal, P., Chahal, D., Le, B.(1996). Production of cellulase in solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* MCG 80 on wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57 (58), 433–442
20. Dashtban M, Schraft H, Qin W.(2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *Int J Biol Sci*; 5(6):578–95.

21. Doi, R. H. (2007). Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome & non-cellulosome producers. *Nature Reviews Microbiology* 2, 541-551.
22. Dueñas Gomez Maritza, Luz Patricia Sánchez- (2008). Searching the Best Conditions for the Extraction and Activity Measurement of Cellulase and Xylanase Extracted from the Yellow Pitaya Fruit Peel (*Acanthocereus pitajaya*) *Acta Hemi. Colomb.*, Vol. 13 No. 1, 217 – 228
23. Durand, H., Soucaille, P., Tiraby, G., (1984). Comparison of study of cellulases and hemicellulases from four fungi: Mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium sp.* And thermophiles *Thielavia terrestries* and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 6, 175–180
24. Enoch Y. Park , Kazuya Naruse , Tatsuya Kato. (2011). Improvement of cellulase production in cultures of *Acremonium cellulolyticus* using pretreated waste milk pack with cellulase targeting for biorefinery *Bioresource Technology* 102 6120–6127
25. Eriksson, Tjenerld & Olsson L. (2003). Purification and characterization of five celulasas and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888, *Enzyme microbtechnol*, 32 pg 941-962
26. Eriksson Torny, Karlsson Johan and Folke Tjerneld (2002) A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei* *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volume 101, Issue 1, pp 41-60
27. Fatma Uzbaz, Ugur Sezerman, Lukas Hartl, Christian P. Kubicek, Bernhard Seiboth (2012) A homologous production system for *Trichoderma reesei* secreted proteins in a cellulase-free background. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1601–1608
28. Fujita, Y., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Kawaguchi, T., Arai, M., Fukuda, H. & Kondo, A. (2002). Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol.* 68, 5136-41.
29. Florence Mingardon, Angélique Chanal, Ana M. (2007). Incorporation of Fungal Cellulases in Bacterial Minicellulosomes Yields Viable Synergistically Acting Cellulolytic Complexes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(12):3822.

30. Gábor Giczey, Zoltán Kerényi László Fülöp. (2001). Expression of cmg1, an Exo- $\beta$ -1,3-Glucanase Gene from *Coniothyrium minitans*, Increases during Sclerotial Parasitism, *Appl Environ Microbiol*. February; 67(2): 865–871
31. Gibbs P.A., Seviour R.J. and Schmid F.(2000). Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 20, No. 1 : Pages 17-48
32. Gurpreet Singh Dhillona, Surinder Kaura, B, Satinder Kaur Brara, Mausam Verma. (2002). Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and Hemicellulose bioproduction through solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products* 38 6– 13
33. Grigorevski de-Limaa AL, do-Nascimento RP, da-Silva Bon EP, Coelho RR. (2005). *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial byproducts and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme Microb Technol* ;37:272–7.
34. Hamed Belghith, Semia Ellouz-Chaabouni, Ali Gargouri. (2001). Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases, *Journal of Biotechnology* 89 257–262
35. Heck JX, Hertz PF, Ayub MAZ. (2002). Cellulase and xylanase production by isolated Amazon bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Braz J Microbiol* ;33:213–8.
36. Henrissat, B. &Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl-hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*. 293 (Pt 3), 781-8.
37. Henrissat, B. & Romeu. (1995). A. Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl-hydrolases. *Biochem J*. 311 (Pt 1), 350-1.
38. Henriksson G, Nutt A, Henriksson H, Pettersson B, Ståhlberg J, Johansson G, Pettersson G.(1999) Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur J Biochem*. Jan;259(1-2):88-95
39. Hreggvidsson GO, KaisteE, Holst O, Eggertsson G, Palsdottir A, Kristjansson AJ. (1996). An extremely thermostable cellulase from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. *Appl Environ Microbiol*;62:3047–9.

40. Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*.315, 804-7.
41. Hölker U, Höfer M, Lenz J. (2004) Biotechnological advantages of laboratoryscale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*;64:175–86
42. Jacyno JM, Harwood JS, Lee MK. (1993) "Isocladosporin, a biologically active isomer of cladosporin from *Cladosporium cladosporioides*." *J Nat Prod* 56(8):1397–1401.
43. Kadla, J. F. & Gilbert, R. D. (2000). Cellulose structure: A review.*Cellul Chem Technol*. 34, 197-216.
44. Karlsson J, Saloheimo M, Siika-Aho M, Tenkanen M, Penttilä M, Tjerneld F.(2001) Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem*. Dec;268(24):6498-507
45. Klemm Djeter, Brigitte Heublein, Hans-Peter Fink . Habil. Andreas Bohn Dr. (2005) Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* Volume 44, Issue 22, pages 3358–3393
46. Krishna C. (1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresour Technol* ; 69:231–9.
47. Kruus K, Wank W.K., J Ching and J H Wu (1995) Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* CelS, a major cellulosome component. *J.Bacteriol*. 177(6):1641
48. La Mantia, M. Monreale Green Composites: A Brief Review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, Volume 42, Issue 6, June 2011, Pages 579–588
49. Lin, Y. & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 69, 627-642.
50. Linder, M. & Teeri, T. T. (1996). The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc Nat Acad Sci USA*. 93, 12251-12255.

51. Manabu S. Fusao T. (2001). Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 92, No. 4, 305-311.
52. Martínez- Ayala C. (2008) Celulasas Fúngicas: Aspectos biotecnológicos y aplicaciones en la industria energética, *Rev. LatinoamMicrobiol* ; 50 (3-4) 119-131
53. Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F. et al. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol.* 22, 695-700.
54. Martinez Ricardo, Mendoza Silvia, Reguera Edilso, Ortiz Pedro, and De la Luz Martínez Jos. (2001). Kinetic Approach to Nixtamalization of Corn Pericarp *Cereal Chemistry Journal*, Volume 78, Number 2 , Page 107
55. Mathew GM, Sukumaran RK, Singhania RR, Ashok P. (2008). Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *J Sci Ind Res*;67(11):898–907.
56. Mantyla A, Paloheimo M, Suominen P. (1998). Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*. In: Harman GE, Kubicek CP, editors. *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2. London, UK: Taylor & Francis Ltd.;. P. 291–309
57. Marja Ilmén, Saloheimo Anu, Maija-Leena Onnela y Merja E. Penttilä (1994) Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and environmental microbiology*, vol 63 No. 4 pgs 1298-1306
58. Miettinenoinonen, A.S.K., Elovainio, M.J.(1990). Cellulases composition for treatment of cellulose-containing textiles with reduced strength loss. Patent No. 97-02293. Rajamaki, Finland.
59. Muhammad Sohail, Roquya Siddiqi, Aqeel Ahmad, Shakeel Ahmed Khan (2009) Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*. Volume 25, Issue 6, Pages 437–441
60. Paredes Medina D, M. Álvarez Núñez, M. Silva Ordoñez. (2009). Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el

61. Park IH, Chang J, Lee YS, Fang SJ, Choi YL.(2012) Gene cloning of endoglucanase Cel5A from cellulose-degrading *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 and purification and characterization of the recombinant enzyme. *Protein J.* Mar;31(3):238-45.
62. Perez-Pons Josep, Cayetano Antonio, Rebordosa Xavier, Loberas Jorge, Guasch Alicia y Querol Enrique. (1994) .B-glucosidase gene (bg23) from *Streptomyces* sp. strain QM-B814. *Eur. J. Biochem.* 223, 557-565
63. Ramos Roberto , M. Gutiérrez-Correa .(1994). Determinación de los patrones electroforéticos de celulasas producidas por *Trichoderma reesei* LM-UC4 Biota, *Revista de ciencias biológicas* Vol. 99.
64. Reeta Rani Singhaniaa, Rajeev K. Sukumarana, Anil Kumar Patelb, Christian Larrocheb, Ashok Pandeya. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases, *Enzyme and Microbial Technology* 46 541–549
65. Samson, RA, Hoekstra, ES, and Frisvad, JC. (2004). Introduction to food and airborne fungi. 7th, -389 p. Baarn, Centralalbureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
66. Saha BC. (2004). Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochem*;39:1871–6
67. Singhania RR, Sukumaran RK, Pandey A. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. *Appl Biochem Biotechnol* 2007;142:60–70.
68. Shen X, Xia L. (2004). Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. *Process Biochem*;39:1363–7.
69. Szijarto N, Faigl Z, Réczey K, Mézesc M, Bersényi A. (2004). Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent

utilization of homeproduced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. *Ind Crops Prod*;20:49–57

70. Travis Henry, Peter C. Iwen, and Steven H. Hinrichs. (2000) Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2 *J. Clin. Microbiol.* April vol. 38 no. 4 1510-1515
71. Villena GK, Gutierrez-Correa M. (2007). Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Lett Appl Microbiol.* ISSN 0266-8254 .
72. Vintila T, Dragomirescu M, Jurcoane S, Vintila D, Caprita R, Maniu M. (2009). Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. *Romanian Biotechnol Lett*;14:4275–81.
73. Wei-Cheng Sun, Chung-Hsien Cheng, Wen-Chien Lee. (2008). Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on rice straw, *Process Biochemistry* 43 1083–1087
74. Wilder, B. M. & Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls: IV. A structural comparison of the wall hemicellulose of cell suspension cultures of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiol.* 51, 889-893.
75. Withers, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym.* 44, 325-337
76. Xia L & Cen P. (1999) . Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry, *Process Biochem*, 34 909-912
77. Xian-Ling Jia, Wen-Ting Zhanga, Ying-Ping Gaib, Bao-Yun Lua, Chuan-Zhong Yuana, Qing-Xin Liua, Zhi-Mei Mua, (2012) Patterns of lignocellulose degradation and secretome analysis of *Trametes trogii* MT. *International Biodeterioration & Biodegradation* Volume 75, Pages 55–62
78. Xu F, Yano S, Inoue H, Sawayama S. (2009). Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulase production by mutation. *J Biosci Bioeng*;107(3):256–61.
79. Yamada Ryosuke, Nakatani Yuki, Ogino Chiaku, Akihiko Kondo (2012) Efficient direct ethanol production from cellulose by cellulase- and cellodextrin transporter-co-expressing *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express* 3:34

80. Ye Sun, Jia yang Cheng. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review *Bioresource Technology* 83 1–11
81. Zugenmaier P. (2008). Crystalline cellulose and derivatives: Characterization and structures in. *Jurnal of Characterization and Structures* vol 23 (pp. 7–8 )
82. Zhiyou Wen , Wei Liao, Shulin Chen. (2005). Production of cellulase/b-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry* 40 3087–3094
83. Zverlov VV, Velikodvorskaya GA, Schwarz WH (2001) New cellobiohydrolase Cel5O in the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: binding to cellulose and indication for processive hydrolysis of the substrate from the reducing end. *Microbiol.* 148: 247-255



## APÉNDICE 1

### **Preparación de los Reactivos utilizados en los ensayos de actividad enzimática**

#### Solución de Caboximetilcelulosa:

Pesar 1g de Carboximetilcelulosa (Sigma-aldrich) viscosidad media y disolver en 100ml de agua destilada (requiere agitación vigorosa para su disolución).

#### Solución de Celulosa Microcristalina al 1%:

Se pesa 1g de celulosa microcristalina y se suspende en 100ml de agua (el reactivo es insoluble, por lo que solo se creará una suspensión).

#### Solución de p-nitrofenil $\beta$ -D, Glucopiranosido (pNGP) 1 milimolar:

Se pesan 13.9mg de pNGP y se disuelven en 80ml de agua destilada. Se afora a un volumen final de 100ml. (Almacenar en condiciones de obscuridad ya que el reactivo es sensible a la luz)

#### Solución de p-nitrofenil $\beta$ -Celobiósido (pNPC) 1 milimolar:

Se pesan 4.16mg de pNPC y se disuelven en 80ml de agua destilada. Se afora a un volumen final de 100ml. (Almacenar en condiciones de obscuridad ya que el reactivo es sensible a la luz)

#### Solución de p-nitrofenil $\beta$ -D,Lactósido (pNPC) 1 milimolar:

Se pesan 5.86 mg de pNPC y se disuelven en 80ml de agua destilada. Se afora a un volumen final de 100ml. (Almacenar en condiciones de obscuridad ya que el reactivo es sensible a la luz)

#### Reactivo de DNS (para 200ml):

Solución 1: Se pesan 2g de NaOH y se disuelven en 50ml de agua con agitación continua. Posteriormente se agregan 2g de ácido 3,5 Dinitrosalisílico y se deja disolver completamente.

Solución 2: en 100ml de agua se disuelven 40g de Tartrato de sodio y potasio con agitación continua. Finalmente se mezclan ambas soluciones y se aforan a 200ml.

Buffer Citrato-Fosfato:

Se pesan 1,470g de citrato de sodio dihidratado y 0,599g de fosfato monobásico de sodio. Se agrega agua destilada hasta obtener un volumen de 100ml, se ajusta el pH a 6.0 con HCl 1N.

NaOH 0.1M:

Se pesan 0.4g de Hidróxido de Sodio y se disuelven en 50ml de agua, una vez disuelto se afora a 100ml

Solución stock de glucosa 10mg/ml:

Se pesa 1g de glucosa y se disuelve en 50 ml de agua. Se afora a un volumen final de 100ml.

Solución stock de p-nitrofenol 1milimolar:

Se pesan 0,0139g de p-Nitrofenol y se aforan a 100ml de agua destilada. Se realizan diferentes estándares realizando las diluciones siguientes:

## APENDICE 2

### Realización de las curvas patrón para la determinación de concentración de los productos formados de las reacciones Enzimáticas

#### Azucares Reductores como Glucosa:

##### Reactivos:

Solución stock de glucosa 10mg/ml:

Reactivo de DNS:

##### Metodología:

Se realizan diferentes estándares realizando las diluciones siguientes

Concentración (mg/ml)	Volumen de Stock	Volumen de Agua
0.1	10µl	990µl
0.5	50µl	950µl
1	100µl	900µl
2	200µl	800µl
3	300µl	700µl
4	400µl	600µl
5	500µl	500µl

Se agregan 200µl de cada stock y 200µl de DNS y se hierven durante exactamente 5 minutos. Posteriormente se agregan 5 ml de agua destilada fría para terminar la reacción y se incuba en baño de hielo. Se lee la absorbancia por espectrofotometría a 540nm.

### APENDICE 3

#### Realización de la curva patrón de liberación de p-nitrofenol

##### Reactivos:

Solución stock de p-nitrofenol 1 milimolar:

Concentración μMolar	Volumen de Stock	Volumen de Agua
0	---	1000μl
10	10μl	990μl
100	100μl	900μl
200	200μl	800μl
300	300μl	700μl
400	400μl	600μl
500	500μl	500μl
600	600μl	400μl
700	700μl	300μl
800	800μl	200μl
900	900μl	100μl
1000	1000μl	---

Se realiza la determinación de la concentración leyendo la absorbancia por espectrofotometría a 412nm.

**APENDICE 4**  
**PROTOCOLO PARA LA ELABORACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA**  
**(SDS-PAGE)**

**Reactivos:**

Reactivos	4% (Stacking)	7,5%	10%	12%	12% Zymogram
Acrilamida/Bis (Bio-Rad)	0,66ml	3,75 ml	2.04 ml	2,4 ml	2,4 ml
1,5M Tris-HCl pH=8,8	-----	3,75	1.56 ml	1,5 ml	1,5 ml
0,5M Tris-HCl pH=6,8	1,26ml	-----	-----	-----	-----
10%SDS	50µl	150 µl	60 µl	60 µl	60 µl
H <sub>2</sub> O Desionizada	3 ml	7,28 ml	2.28 ml	2 ml	0,7ml
TEMED	6 µl	7,5 µl	6 µl	6 µl	6 µl
APS 10%	25 µl	75 µl	30 µl	30 µl	30 µl
MUC---CMC	----	---	---	---	1,4ml
Vol Final	5 ml	6ml	6ml	6ml	6ml

**Tris-HCl 1,5M pH=8.8 (100ml)**

Pesar 18.5g de Tris Base, disolver en 80ml de agua desionizada, ajustar el pH a 8.8 y aforar a 100ml.

**Tris-HCl 0,5M pH=6,87 (100ml)**

Pesar 6 gramos de Tris Base y agregar 60ml de agua desionizada, disolver bien y ajustar el pH a 6.8 con HCl 6N. Aforar a 100ml.

**10% APS**

Pesar 0,1g de SDS y agregar 0,9ml de agua des ionizada (debe prepararse reciente).

**10% SDS**

Pesar 1g de SDS y disolverlo en 99ml de agua desionizada.

**Solución de tñido (100ml)**

0.25g de azul de coomasie, 45ml de metanol y 10 ml de ácido acético. Aforar a 100ml

**Solucion de desteñido (500ml)**

100 ml de metanol, 75ml de ácido acético glacial y 325ml de agua desionizada.

**2x SDS- PAGE-Sample Buffer.**

Reactivo	Volumen
0.5M Tris-HCl pH=6.8	1.875 ml
50% glicerol	7.5ml
1% azul de bromofenol	0.15ml
10% SDS	3ml
Agua desionizada	Comp. 15ml

## APENDICE 5

### Secuencia de la región amplificada del ITS del 5.8S RNA del *Cladosporium*

#### *cladosporioides*

AACACCGGGGAGTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCG  
GGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAA  
AACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG  
AATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCAT  
GCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCATCGCGTCCGCCGCGTGCCTC  
AAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCTGGGAGG  
CTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG  
CATATCATAAANCCNGGAGGAAACTAATCGAGGTCACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGC  
CTCCCGAACACCCTTTAGCGAATAGTTTCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTG  
AGGCACGCGGCGGACCGCGATGCCAATACCAAGCGAGGCTTGAGTGGTCAAATGACGCTCGAACAG  
GCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAA  
TTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTAAAAGTT  
TTAATTTATTAATTAAGTTTACTCAGACTGCAAAGTTACGCAAGAGTTTGAAGTGTCCACCCGGAGCCCC  
CGCCCGAAGGCAGGGTCGCCCCGGAGGCAACAGAGTCGGACAACAAAGGGTTATGAACATCCCGGTG  
GTTAGACCGGGTCACTTGTAATGATCCCTCCGCAGGCACCCNTACGAAA